

Filipa Alexandra Delgado Siopa

Licenciada

Modificação de proteínas e DNA por quinonas derivadas de catecolaminas

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Química
Especialidade de Química Orgânica, pela Universidade Nova de Lisboa,
Faculdade de Ciências e Tecnologia

Orientador: Paula Cristina de Sérgio Branco, Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa
Co-orientador: Maria Matilde Soares Duarte Marques, Professora Associada com Agregação, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa

Dezembro de 2011

Nº de Arquivo:

Copyright:

Aos meus pais, ao Daniel e à Maria Francisca

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação contou com a colaboração de pessoas e instituições às quais dirijo os seguintes agradecimentos:

Às Professoras Doutoras Paula Branco e Matilde Marques, por terem aceite orientar esta tese, pela inteira disponibilidade e pelos valiosos contributos.

À Doutora Luísa Ferreira pelo seu apoio e sugestões.

À Doutora Alice Pereira pela ajuda na área “Bio”.

Às Doutoras Ana Lourenço, Manuela Perreira, Maria Manuel Marques e Alexandra Antunes, pelo incentivo e constante simpatia.

À Dra. Maria do Rosário Altas pela colaboração na realização dos espectros de ressonância magnética nuclear, pela força e entusiasmo.

À Dra. Luz Fernandes e à Doutora Conceição Oliveira pelas análises de espectrometria de massa.

Agradeço ainda às redes nacionais de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear pelo acesso aos aparelhos.

A todos os colegas e amigos de laboratório, pelo ambiente ímpar de companheirismo, e em especial, à Isabel Ribau pela amizade, e à Ana Sofia Ferreira pela disponibilidade e ajuda no processo de escrita desta dissertação.

Às amigas Dulce Fernandes, Gisela Borges e Isabel Félix pela amizade e por acreditarem em mim.

Aos meus pais, ao Daniel e à Maria Francisca, por tudo o que representam e pela compreensão e apoio incondicional.

Um agradecimento final à Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo apoio financeiro que me concedeu através da bolsa de doutoramento SFRH / BD / 39171 / 2007.

Resumo

A dopamina (DA) é um importante neurotransmissor envolvido na doença de Parkinson, uma desordem neurológica degenerativa. Outras catecolaminas (CA) representativas são a α -metildopamina (MeDA) e a *N*, α -dimetildopamina (diMeDA), metabolitos tóxicos da droga recreativa 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA ou *Ecstasy*), conhecida por induzir efeitos neurotóxicos graves. O metabolismo da DA, MeDA e diMeDA envolve a produção de espécies altamente reactivas, nomeadamente *o*-quinonas, que a pH neutro, podem sofrer ciclização intramolecular e polimerização. Com o objectivo de estudar as potenciais vias de toxicidade da DA, utilizou-se como compostos modelo, a *N*-acetildopamina (NADA) e a *N*-benziloxicarbonildopamina (DA-Cbz). A estratégia sintética envolveu a oxidação *in vitro* das CA com um oxidante enzimático (*mushroom tyrosinase*) ou químico (NaIO₄, Sal de Frémy e Ag₂O), e subsequente adição de bionucleófilos (aminoácidos, nucleósidos, DNA, péptidos e proteínas representativas). Verificou-se que as reacções das CA com as biomoléculas são regioselectivas, sendo a posição de modificação no anel da CA dependente do nucleófilo. Nas reacções com nucleófilos de enxofre (*N*-acetil-cisteína, cisteína, glutatona), a modificação ocorreu maioritariamente na posição 5, enquanto nas reacções com nucleófilos de azoto (*N*-acetil-histidina e imidazole) a modificação ocorreu na posição 6 do anel da CA.

Investigou-se ainda a formação de aductos de CA como biomarcadores de toxicidade, através da modificação das proteínas albumina do soro humano (HSA), hemoglobina Humana (Hb) e *horse heart myoglobin* (hhMb). Foi previamente modificado o péptido modelo da HSA, LQQCPF, tendo como objectivo caracterizar os aductos peptídicos obtidos. Estes foram utilizados como padrões na caracterização, por técnicas de espectrometria de massa (MS), dos resíduos modificados nas proteínas. As proteínas modificadas foram sujeitas, em paralelo, a hidrólise enzimática a péptidos e a aminoácidos, e os resíduos modificados foram caracterizados por MALDI-TOF-MS (Espectrometria de Massa de Tempo de Voo com Des-sorção e Ionização com Laser Assistida por Matriz) e por LC-ESI-MS/MS (Cromatografia Líquida – Espectrometria de Massa Tandem com Ionização por Electrospray). Foram identificados três aductos de NADA com a HSA (Gln204, H321, e V216), dois aductos com a Hb (His97 na Hb- β , e His58 na Hb- α), e dois aductos com a hhMb (Phe43 ou Asp44, e Lys45). A HSA foi ainda modificada com os metabolitos do *Ecstasy*, MeDA e diMeDA. Este procedimento permitiu identificar os pontos de susceptibilidade reactiva nas proteínas estudadas, que podem eventualmente determinar as características toxicológicas das diferentes quinonas.

Palavras chave: Aminoácidos, Catecolaminas, Dopamina, *Ecstasy*, Proteínas, Quinonas.

Abstract

Catecholamines comprise a distinct class of biomolecules of which dopamine (DA) is one of the most familiar. DA is an important neurotransmitter, involved in the pathogenesis of Parkinson's disease, a degenerative neurological disorder. Other representatives of this class, such as α -methyldopamine (MeDA) and *N*, α -dimethyldopamine (diMeDA), are toxic metabolites of the recreational drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or *Ecstasy*).

One of the major metabolic pathways of DA, MeDA and diMeDA is oxidation to *ortho*-quinones, which at neutral pH, undergo intramolecular cyclization and polymerization. To elucidate potential toxicity pathways of DA, *N*-acetyldopamine (NADA), as well as *N*-benzyloxycarbonyldopamine (DA-Cbz) were used as model compounds. The synthetic strategy involved the oxidation *in vitro* of the CA, by enzymatic (*mushroom tyrosinase*) or chemical (NaIO₄, Frémy's Salt e Ag₂O) methods, with subsequent addition of bionucleophiles (aminoacids, nucleotides, DNA, peptides and representative proteins). The reaction of CA with biomolecules, such as *N*-acetyl-cysteine, cysteine, glutathione, *N*-acetyl-histidine and imidazole, proved to be regioselective, with the position of modification dependent on the nucleophile. On reaction with sulfur nucleophiles the CA modification occurred mainly at the 5-position, while with nitrogen nucleophiles the modification took place at the 6-position in the aromatic ring of the CA.

The modification of LQQCPF, a model peptide of Human serum albumin (HSA), with sulfur and nitrogen nucleophiles, allowed the isolation and characterization of peptide adducts that were used as standards in Mass Spectrometry (MS). Protein adducts of CA, which could be used as biomarkers of toxicity, were obtained by modifying the proteins HSA, Human hemoglobin (Hb), and horse heart myoglobin (hhMb). The modified proteins were enzymatically hydrolyzed to peptides and to aminoacids, and the modified residues were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight – Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS) respectively. It was possible to identify three NADA adducts in HSA (Gln204, H321, V216), two adducts in Hb (His97 in Hb- β , and His58 in Hb- α), and two adducts in hhMb (Phe43 or Asp44, and Lys45). This procedure allowed the identification of reactive sites in the tested proteins, which may potentially determine the toxicological characteristics of the different quinones.

Keywords: Aminoacids, Catecholamines, Dopamine, *Ecstasy*, Protein adducts, Quinone.

Índice de Matérias

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
I.1 A Dopamina	3
I.1.1 Biossíntese, metabolismo e citotoxicidade da dopamina	3
I.1.2 Preparação de conjugados de enxofre da dopamina	6
I.2 A N-acetildopamina	10
I.2.1 Preparação de conjugados de enxofre da N-acetildopamina	11
I.2.2 Preparação de conjugados de azoto de catecolaminas	11
I.3 Formação de aductos de DNA	12
I.3.1 Formação de aductos despurinantes de DNA com as <i>orto</i> -quinonas da DA e NADA	12
I.4 Os metabolitos do Ecstasy	14
I.4.1 Síntese e citotoxicidade dos metabolitos do Ecstasy	14
I.4.2 Reacções com os metabolitos do Ecstasy, MeDA e diMeDA	16
I.5 Aductos de proteínas como biomarcadores de toxicidade	17
I.5.1 A HSA como biomolécula de monitorização de espécies electrófilas reactivas	19
I.5.2 Hb e hhMb como biomoléculas de monitorização de espécies electrófilas reactivas	22
I.5.3 Métodos de identificação de aductos de proteínas/péptidos	26
CAPÍTULO II – DISCUSSÃO DE RESULTADOS	33
II.1 Síntese e caracterização de derivados N-substituídos da DA	35
II.2 Síntese dos metabolitos do Ecstasy	38
II.3 Preparação e caracterização de derivados sulfidrilo de CA	40
II.3.1 Preparação por oxidação enzimática de derivados sulfidrilo da DA, NADA e DA-Cbz	40

II.3.2	Preparação por oxidação enzimática de derivados sulfidrilo da MeDA e diMeDA	48
II.3.3	Preparação por oxidação química de derivados sulfidrilo de CA	51
II.3.4	Em Resumo:	55
II.4	Preparação e caracterização de derivados de azoto de CA	56
II.4.1	Preparação e caracterização de derivados de azoto da DA e NADA	56
II.4.2	Preparação e caracterização de derivados de azoto da MeDA e diMeDA	66
II.4.3	Em Resumo:	68
II.5	Estudos de RMN e espectrofotométricos das CA-quinonas	68
II.5.1	Em Resumo:	72
II.6	Reacções da DA e NADA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenina e com o DNA	72
II.6.1	Em Resumo:	74
II.7	Modificação das proteínas HSA, Hb e Mb e do péptido LQQCPF por CA	75
II.7.1	Notas prévias:	75
II.7.2	Introdução geral	77
II.7.3	Reacção de CA com o péptido LQQCPF	78
II.7.3.1	Estudos prévios	78
II.7.3.2	Reacções de modificação de CA	81
II.7.3.3	Em Resumo:	90
II.7.4	Determinação da massa intacta das proteínas modificadas HSA, Hb, hhMb por MALDI-TOF-MS	91
II.7.4.1	Análise de massa intacta da HSA	91
II.7.4.2	Análise de massa intacta da Hb	94
II.7.4.3	Análise de massa intacta da hhMb	96
II.7.4.4	Em Resumo:	97
II.7.5	Identificação dos aductos peptídicos por MALDI-TOF-TOF-MS	98
II.7.5.1	Identificação dos péptidos por MALDI-TOF-TOF-MS das proteínas HSA, Hb e hhMb	98
II.7.5.2	Modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2	102
II.7.5.3	Modificação da HSA, Hb com as CA numa razão CA/proteína 1:20	113
II.7.5.4	Em Resumo:	120
II.7.6	Identificação dos aminoácidos modificados por LC-ESI-MS/MS	122

II.7.6.1	Modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2	127
II.7.6.2	Modificação da HSA e Hb, numa razão CA/proteína 1:20	132
II.7.6.3	Hidrólise da HSA modificada com MeDA e diMeDA	137
II.7.6.4	Hidrólise dos péptidos modificados com as CA	138
II.7.6.5	Aductos identificados após hidrólise aos a.a. e análise por LC-ESI-MS/MS	140
II.7.6.6	Em Resumo:	141
II.7.6.7	Comparação dos resultados da aproximação realizada para identificação dos resíduos modificados nas proteínas HSA, Hb, hhMb por CA	142
II.8	Conclusões	145
CAPÍTULO III	– PARTE EXPERIMENTAL	147
III.1	Preâmbulo	149
III.1.1	Reagentes e solventes	149
III.1.2	Equipamento	150
III.1.3	Numeração de compostos	153
III.2	Síntese do metabolito do <i>Ecstasy</i>, α-metildopamina (38)	154
III.2.1	Preparação do composto <i>trans</i> -1-(3,4-dimetoxifenil)-2-nitropropeno (64)	154
III.2.2	Preparação do composto (<i>R,S</i>)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-amino- propano (101)	154
III.2.3	Preparação do hidrocloreto (<i>R,S</i>)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-amino- propano (66)	155
III.2.4	Preparação do composto α -metildopamina (38)	155
III.3	Síntese do metabolito do <i>Ecstasy</i>, <i>N</i>,α-dimetildopamina (37)	156
III.3.1	Preparação do composto 1-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-ona (67)	156
III.3.2	Preparação do composto 1-(3,4-dimetoxifenil)- <i>N</i> -metilpropan-2- -amina (102)	157
III.3.3	Preparação do composto hidrocloreto (<i>R,S</i>)-1-(3,4-dimetoxifenil)- <i>N</i> -metilpropan-2-amina (69)	157
III.3.4	Preparação do composto <i>N</i> , α -dimetildopamina (37)	158
III.4	Síntese do hidrocloreto de (<i>R,S</i>)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (40)	158
III.4.1	Preparação do composto 2-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)fenol (65)	158

III.4.2	Preparação do composto (<i>R,S</i>)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (103)	159
III.4.3	Preparação do hidrocloreto de (<i>R,S</i>)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (40)	159
III.5	Síntese do hidrocloreto (<i>R,S</i>)-1-(3,4-dimetoxifenil)-<i>N</i>-metilpropan-2-amina (39)	159
III.5.1	Preparação do composto 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propa-2-ona (68)	159
III.5.2	Preparação do composto (<i>R,S</i>)-2-metoxi-4-(2-metilaminopropil)fenol (104)	160
III.5.3	Preparação do composto hidrocloreto (<i>R,S</i>)-1-(3,4-dimetoxifenil)- <i>N</i> -metilpropan-2-amina (39)	160
III.6	Preparação de derivados da dopamina	161
III.6.1	Preparação do composto <i>N</i> -benziloxycarbonil-3,4-dihidroxifeniletíl- amina (60)	161
III.6.2	Preparação de derivados de CA acetilados	161
III.6.2.1	Síntese do composto <i>N</i> -acetildopamina (20)	162
III.6.2.2	Síntese do composto <i>N</i> -acetil- α -metildopamina (89)	162
III.6.2.3	Síntese do composto <i>N</i> -acetil-di- <i>O</i> -acetil- <i>N</i> , α -dimetildopamina (105)	162
III.7	Preparação de conjugados de CA com nucleófilos de enxofre	163
III.7.1	Por oxidação enzimática de CA	163
III.7.1.1	Reacção da dopamina com a glutatona	164
III.7.1.2	Reacção da dopamina com a <i>N</i> -acetil-cisteína	165
III.7.1.3	Reacção da dopamina com a cisteína	166
III.7.1.4	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com a glutatona	167
III.7.1.5	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com a <i>N</i> -acetil-cisteína	167
III.7.1.6	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com a cisteína	168
III.7.1.7	Reacção da <i>N</i> -benziloxycarbonildopamina com a glutatona	168
III.7.1.8	Reacção da <i>N</i> -benziloxycarbonildopamina com a <i>N</i> -acetil-cisteína	169
III.7.1.9	Reacção da <i>N</i> -benziloxycarbonildopamina com a cisteína	169
III.7.1.10	Reacção da α -metildopamina com a cisteína	170
III.7.1.11	Reacção da <i>N</i> , α -dimetildopamina com a cisteína	170
III.7.2	Por oxidação química de CA	170
III.7.2.1	Reacção da DA, NADA e DA-Cbz com nucleófilos de enxofre	171
III.7.2.1.1	Caracterização dos compostos, apresentados na Tabela III.1:	173
III.8	Preparação de conjugados de CA com nucleófilos de azoto	175

III.8.1	Por oxidação enzimática de CA	175
III.8.1.1	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com a <i>N</i> -acetil-histidina	175
III.8.1.2	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com o imidazole	176
III.8.2	Por oxidação química de CA	176
III.8.2.1	Reacção da <i>N</i> -acetildopamina com a <i>N</i> -acetil-histidina e o imidazole	177
III.8.2.2	Reacção da <i>N</i> -acetil- α -metildopamina com a <i>N</i> -acetil-histidina	178
III.8.2.3	Reacção da <i>N</i> , α -dimetildopamina com a <i>N</i> -acetil-histidina	178
III.9	Preparação de conjugados de CA com os aminoácidos valina, triptofano, <i>N</i>-acetil-lisina, lisina, serina e histidina	178
III.10	Preparação de conjugados de CA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenina	180
III.11	Estudos de RMN	181
III.11.1	Oxidação enzimática da CA	181
III.11.2	Oxidação química da CA	181
III.12	Estudos espectrofotométricos	181
III.12.1	Oxidação enzimática da CA	181
III.13	Hidrólise de conjugados da <i>N</i>-acetildopamina e <i>N</i>,α-dimetildopamina	182
III.13.1.1	Hidrólise de 6-[(<i>N</i> -Acetil)histidin- <i>N</i> 1'-il]- <i>N</i> -acetildopamina (25)	182
III.13.1.2	Hidrólise de (6-Imidazol- <i>N</i> 1'-il)- <i>N</i> -acetildopamina (29)	183
III.13.1.3	Hidrólise de <i>N</i> -acetil-di- <i>O</i> -acetil- <i>N</i> , α -dimetildopamina (105)	183
III.14	Reacções da dopamina e <i>N</i>-acetildopamina com o DNA	184
III.15	Reacções de CA com o péptido LQQCPF	185
III.15.1	Caracterização do péptido LQQCPF	185
III.15.2	Por oxidação enzimática de CA	185
III.15.2.1	Reacção com <i>N</i> -acetildopamina	186
III.15.2.2	Reacção com dopamina	186
III.15.2.3	Reacção com a α -metildopamina	187
III.15.2.4	Reacção com a <i>N</i> , α -dimetildopamina	188
III.16	Reacções de modificação de proteínas com CA	188
III.16.1	Reacções de modificação da HSA	188
III.16.1.1	Por oxidação enzimática de CA	188

III.16.1.2	Por oxidação química de CA	189
III.16.2	Reacções de modificação de Hb e hhMb com NADA	190
III.16.2.1	Por oxidação enzimática da NADA	190
III.16.2.2	Por oxidação química da NADA	190
III.17	Condições de hidrólise das proteínas e do péptido LQQCPF	191
III.17.1	Digestão aos péptidos das proteínas modificadas	191
III.17.1.1	Condições de hidrólise	191
III.17.2	Digestão aos aminoácidos das proteínas e do péptido modificados	191
III.17.2.1	Condições gerais	191
III.17.2.2	Ensaio com temperatura a 50°C	192
CAPÍTULO IV	– BIBLIOGRAFIA	193

Índice de Figuras

Figura I.1 - Figura de um cérebro humano, (adaptado). ¹³	5
Figura I.2 - Representação da estrutura cristalina da HSA obtida por difracção de raios-X. ⁷³	19
Figura I.3 – HHPA (59).	24
Figura I.4 - Estrutura da hhMb obtida por difracção de raios-X. Podemos observar os resíduos chave (marcados com nome e número), o grupo hemo (a azul) e quatro átomos de xénon, que representam as cavidades internas da proteína. ⁸⁵	25
Figura I.5 - Irradiação por um feixe de laser de uma amostra co-cristalizada com a matriz, e consequente sublimação e ionização das mesmas, (adaptada). ¹⁰²	28
Figura I.6 - Representação esquemática de um MALDI-TOF-MS a funcionar em modo linear (a), ou em modo reflector (b). ¹⁰³	28
Figura I.7 - Representação esquemática de um LC-MS, (adaptado). ¹⁰²	29
Figura I.8 - Representação esquemática, de uma aproximação para identificação dos resíduos modificados de uma proteína por MALDI-TOF-TOF-MS. ⁵⁹	30
Figura I.9. - a) Espectro de MALDI-TOF-MS da HSA nativa e modificada com 12-mesiloxi-NVP (51). b) Espectro de MS/MS do pico a m/z 937,55 da HSA modificada com 51. ⁷²	31
Figura II.1 - Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN da NADA (20).	36
Figura II.2 - Espectro de HMBC do composto DA-Cbz (60).	37
Figura II.3 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 5-GSH-DA (11).	43
Figura II.4 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 2-NACys-DA (71).	43
Figura II.5 - Espectro de HMQC do aducto 5-GSH-NADA (75).	46
Figura II.6 - Espectro de ^{13}C -RMN do aducto 5-GSH-NADA (75).	46
Figura II.7 - Espectro de HMBC do composto 5-GSH-NADA (75).	47
Figura II.8 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 5-Cys-diMeDA (47).	50
Figura II.9 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 6-NACHis-NADA (25).	58
Figura II.10 - Espectro de HMQC do aducto 6-NACHis-NADA (25).	59
Figura II.11 - Espectro de HMBC do aducto 6-NACHis-NADA (25).	60

Figura II.12 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 2-NAcHis-NADA (27).	62
Figura II.13 - Espectros de ^1H -RMN da DA (a) e da DAQ (b), gerada com 2 eq. de NaIO_4 .	69
Figura II.14 - Espectro de próton obtido após a adição de NAcHis (10 eq.) à NADA-quinona, gerada com NaIO_4 (1 eq.).	70
Figura II.15 - Oxidação da NADA (1,39 μM) com <i>tyrosinase</i> . a) Espectros de UV/Vis obtidos com um intervalo de 1 min. b) Dependência da absorvância a 300, 392 e 500 nm como tempo.	71
Figura II.16 - Oxidação da NADA (0,47 μM) com <i>tyrosinase</i> . a) Espectros de UV/Vis obtidos com um intervalo de 1 min. b) Dependência da absorvância a 300, 392 e 500 nm como tempo.	71
Figura II.17 – Estrutura dos aductos 6-N7Gua-DA(NADA) e 6-N3-Ade-DA(NADA).	73
Figura II.18 - Representação esquemática da nomenclatura clássica de fragmentos de iões peptídicos.	75
Figura II.19 - Espectro de ^1H -RMN do péptido LQQCPF.	80
Figura II.20- Espectro de HSQC do péptido LQQCPF.	80
Figura II.21 - Comparação entre os espectros de ^1H RMN (D_2O) do aducto 5-LQQCPF-NADA (95) e do péptido LQQCPF.	83
Figura II.22 - Espectro de HSQC do aducto 5-LQQCPF-NADA (95).	83
Figura II.23 - Espectro de MALDI-TOF-MS do aducto 5-LQQCPF-NADA (95).	85
Figura II.24 - Espectro de MALDI-TOF-TOF-MS do ião a m/z de 928, correspondente ao aducto 5-LQQCPF-NADA (95) protonado.	86
Figura II.25 - Comparação entre os espectros de ^1H RMN (D_2O) dos aductos 2-LQQCPF-DA (96), 5-LQQCPF-DA (97), 5-LQQCPF-MeDA (98) e 5-LQQCPF-diMeDA (99) e o péptido LQQCPF.	89
Figura II.26 - Espectro de MALDI-TOF-MS da a) HSA não modificada e b) modificada, numa razão NADA-quinona/HSA de 1:2.	91
Figura II.27 - Espectros de MALDI-TOF-MS da HSA modificada com diferentes concentrações de NADA-quinona gerada por <i>mushroom tyrosinase</i> . A razão NADA-quinona/HSA foi de: a) 1:4, b) 1:10 e c) 1:20.	92
Figura II.28 - Espectros de MALDI-TOF-MS da HSA modificada com os metabolitos do <i>Ecstasy</i> a) MeDA, b) diMeDA.	94

Figura II.29 - Espectro de MALDI-TOF-MS da Hb.	94
Figura II.30 - Espectros de MALDI-TOF-MS da modificada Hb com NADA-quinona numa razão (NADA/Hb), de: a) 1:2 b) 1:4, c) 1:10, e d) 1:20.	95
Figura II.31 - Espectros de MALDI-TOF-MS da a) hhMb, e b) hhMb modificada.	96
Figura II.32 - Espectros de MALDI-TOF-MS das proteínas HSA, Hb e hhMb hidrolisadas a péptidos com a tripsina. (a) Região do espectro da HSA, entre os 600 e os 2920 <i>m/z</i> . (b) Região do espectro da Hb, entre os 600 e os 2340 <i>m/z</i> . (c) Região do espectro da hhMb, entre os 600 e os 2050 <i>m/z</i> .	99
Figura II.33 - Espectro de MALDI-TOF-MS dos péptidos das proteínas (a) HSA (b) Hb e (c) hhMb modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2 e nativas.	105
Figura II.34 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA não modificado, DDNPNLPR, com os respectivos fragmentos peptídicos a preto. A verde os iões b/y do possível péptido modificado da HSA, ASSAKQR.	107
Figura II.35 - Espectro de MS/MS do péptido da Hb modificado, GHGKK.	109
Figura II.36 - Espectro de MS/MS do possível péptido da hhMb modificado, FDKFK.	110
Figura II.37 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA, HPDYSVLLLLRLAK, modificado com MeDA, e identificação dos fragmentos peptídicos.	117
Figura II.38 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA, CCKADDKETCFAEEGK, modificado com diMeDA, e identificação dos fragmentos peptídicos.	118
Figura II.39 - Representação da estrutura do composto 100. ¹²⁹	120
Figura II.40 – (a) Cromatograma iónico extraído para o ião com <i>m/z</i> 315, e respectivo espectro de massa, (b). LC-ESI-MS/MS do ião 315 (<i>m/z</i>), cromatograma iónico (c) e MS ² , (d).	122
Figura II.41 - (a) Cromatograma iónico extraído para o ião a <i>m/z</i> 349 e respectivo espectro de massa, (b). Espectro de LC-ESI-MS/MS do ião 349 (<i>m/z</i>), cromatograma iónico (c), e espectro de massa, (d). Espectro de LC-ESI-MS/MS/MS do ião 349 (<i>m/z</i>), cromatograma iónico (e), e respectivo espectro de massa, (f).	124
Figura II.42 - (a) Cromatograma iónico total do composto NADA e respectivos espectros de massa, (b). Espectro de LC-ESI-MS/MS do ião 196 (<i>m/z</i>), (c) Cromatograma iónico total e respectivos espectros de massa, (d).	126

- Figura II.43 - (a) Cromatograma iónico total (LC-ESI-MS) entre os 0-17,5 min, da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:2 (HSA-A, filtros de crivagem), obtido após hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP. (b) e (c) Representação dos espectros de massa a t_R de 3,9 min e 11,8 min, respectivamente. 128
- Figura II.44 - (a) Cromatograma iónico total, da reacção da hhMb com NADA numa proporção de 1:2 (hhMb-A), hidrolisada aos a.a. com pronase E e LAP. (b) Espectro de ESI-MS do possível aducto da NADA com o Asp, e respectiva estrutura proposta (c). 129
- Figura II.45 - Sequência da hhMb, com os resíduos de Asp (D) a negrito. 130
- Figura II.46 - Espectro de LC-ESI-MS/MS do ião 327 (m/z). Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito. 131
- Figura II.47 - Sequência da Hb, com os resíduos de Asp (D) a negrito. 132
- Figura II.48 - (a) LC-ESI-MS, cromatograma iónico total, da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:20 (HSA-A), obtido após hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP. (b) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 283, possível aducto protonado da NADA com a Ala, e respectivo espectro de massa, (c). Espectros de LC-ESI-MS/MS obtidos para a fragmentação do ião a m/z 283. (d) Cromatograma iónico total, e respectivo espectro de massa, (e) MS^2 . (f) Cromatograma iónico total e (g) respectivo, MS^3 . (h) Estrutura proposta para o possível aducto da NADA com a Ala. 133
- Figura II.49 - (a) Cromatograma iónico total (LC-ESI-MS), da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:20 (HSA-A), obtido após hidrólise segundo Waidyanatha *et al.*⁷⁷ (b) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 340, e respectivos espectros de massa. (c) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 283 e respectivo MS. 135
- Figura II.50 - (a) Espectro de MS^2 do ião a m/z 339,9. (b) Estruturas propostas para o possível aducto. 136
- Figura II.51 - Representação dos aductos pépticos, 5-LQQCPF-NADA (95), 5-LQQCPF-DA (97), 5-LQQCPF-MeDA (98) e 5-LQQCPF-diMeDA (99). 138
- Figura II.52 - Espectros de LC-ESI-MS; cromatogramas iónicos totais, do péptido LQQCPF (a), e dos aductos 5-LQQCPF-NADA (95) (b), 5-LQQCPF-diMeDA (99) (c), 5-LQQCPF-DA (97) (d) e 5-LQQCPF-MeDA (98) (e). f) Estruturas propostas para os fragmentos peptídicos identificados. 139

Figura III.1 - Representação de CA e um a.a. geral, com a numeração a utilizar ao longo da tese.

153

Índice de Tabelas

Tabela I.1 – Reacções da DA e NADA com dG e Ade, aductos obtidos e rendimentos. ²⁰	13
Tabela II.1 - Dados espectroscópicos da NADA (20).	36
Tabela II.2 - Dados espectroscópicos da DA-Cbz (60).	38
Tabela II.3 - Dados de ¹ H-RMN dos compostos MeDA (38) e diMeDA (37).	40
Tabela II.4 - Rendimento dos aductos isolados, nas reacções de oxidação enzimática da DA, NADA e DA-Cbz com os bionucleófilos, GSH, NAcCys e Cys.	41
Tabela II.5 - Dados espectroscópicos dos aductos 5-GSH-DA (11) e 2-NAcCys-DA (71).	44
Tabela II.6 - Dados espectroscópicos dos aductos 5-GSH-NADA (75).	47
Tabela II.7 - Dados espectroscópicos dos aductos 5-Cys-MeDA (80) e 5-Cys-diMeDA (47).	49
Tabela II.8 - Produtos das reacções de oxidação química da DA, NADA e DA-Cbz com os nucleófilos GSH, NAcCys e Cys.	51
Tabela II.9 - Dados de espectroscópicos dos aductos 2-GSH-NADA (82) e 2,5-GSH-NADA (83).	53
Tabela II.10 - Produtos das reacções entre a NADA-quinona e os nucleófilos NAcHis e Imid.	57
Tabela II.11 - Dados espectroscópicos do aducto 6-NAcH-NADA (25) e 6-Imid-NADA (29)	61
Tabela II.12 - Dados espectroscópicos do aducto 2-NAcH-NADA (27).	62
Tabela II.13 - Dados espectroscópicos do aducto 6-Imid-DA (86).	63
Tabela II.14 - Dados espectroscópicos dos aductos 6-His-DA (87) e 6-His-NADA (88).	64
Tabela II.15 – Reacções da NADA com o triptofano.	65
Tabela II.16 - Produtos da reacção entre as CA, Ac-MeDA (89) e Ac-diMeDA (90) com a NAcHis.	66
Tabela II.17 - Dados espectroscópicos dos aductos 6-NAcHis-Ac-MeDA (91) e 6-NAcHis-Ac-diMeDA (92).	67
Tabela II.18 - Estudos de ¹ H-RMN das respectivas quinonas da DA, NADA e DA-Cbz.	69
Tabela II.19 – Reacções da DA e NADA com dG e Ade, aductos obtidos e rendimentos. ²⁰	73
Tabela II.20 - Reacções da DA e NADA com o DNA.	74

Tabela II.21 – Tabela de aminoácidos: nome, símbolo, abreviatura e estrutura.	76
Tabela II.22 - Dados espectroscópicos obtidos para o péptido LQQCPF.	81
Tabela II.23 - Dados espectroscópicos obtidos para do aducto 5-LQQCPF-NADA (95).	84
Tabela II.24 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido LQQCPF modificado com NADA.	86
Tabela II.25 - Dados espectroscópicos obtidos para os aductos 2-LQQCPF-DA (96), 5-LQQCPF-DA (97), 5-LQQCPF-MeDA (98), 5-LQQCPF-diMeDA (99).	88
Tabela II.26 - Massa intacta da HSA modificada por diferentes quantidades de NADA-quinona, usando <i>tyrosinase</i> como oxidante.	92
Tabela II.27 - Análise de massa intacta da HSA modificada por NADA, usando NaIO ₄ como oxidante.	93
Tabela II.28 - Taxa de resíduos de a.a. modificados na cadeia α e β da Hb, utilizando diferentes proporções de NADA-quinona.	96
Tabela II.29 - Legenda da Figura II.31b.	96
Tabela II.30 - Péptidos da HSA identificados.	100
Tabela II.31 - Péptidos da Hb identificados.	101
Tabela II.32 - Péptidos da hhMb identificados.	102
Tabela II.33 - Resultados do motor de busca Mascot da HSA, Hb e hhMb não modificadas e modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, após hidrólise com a tripsina realizada segundo o método geral B ou por digestão enzimática clássica (*).	103
Tabela II.34 - Identificação dos possíveis aductos peptídicos das proteínas HSA, Hb e hhMb com a NADA.	106
Tabela II.35 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido da HSA, DDNPNLPR.	108
Tabela II.36 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido modificado da Hb- α , GH(NADA)GKK.	109
Tabela II.37 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido modificado da hhMb, FDKFK.	110
Tabela II.38 - Análise do péptido modificado LKCASLQK da HSA, no resíduo de Gln204.	111
Tabela II.39 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS péptido da Hb- β modificado, LH(NADA)VDPENFR.	111

Tabela II.40 - Sequências peptídicas e resíduos modificados com NADA.	112
Tabela II.41 - Massa intacta das proteínas modificadas numa proporção de 1:20 por CA. (Ensaio: “Proteína-A”) oxidante <i>mushroom tyrosinase</i> e (Ensaio: “Proteína-B”) oxidante NaIO ₄	113
Tabela II.42 - Identificação dos iões com <i>m/z</i> compatível com possíveis aductos peptídicos das proteínas HSA e Hb modificadas com CA.	114
Tabela II.43 - Péptidos não modificados identificados nas reacções de modificação da HSA e Hb com CA e respectiva fragmentação.	115
Tabela II.44 - Sequências peptídicas e resíduos modificados com NADA, MeDA e diMEDA. Iões b/y identificados.	119
Tabela II.45 - Reacções de modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, usando como oxidante <i>mushroom tyrosinase</i> (Ensaio: “Proteína-A”) ou NaIO ₄ (Ensaio: “Proteína-B”), seguidas de hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP.	127
Tabela II.46 - Resultados das análises de LC-ESI-MS/MS realizadas para as reacções de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb por CA. As quinonas foram geradas com <i>mushroom tyrosinase</i> (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO ₄ (Ensaio: “Proteína-B”).	140
Tabela II.47 - Resumo dos resultados das análises de MALDI-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS realizadas para as reacções de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb por CA. As quinonas foram geradas com <i>mushroom tyrosinase</i> (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO ₄ (Ensaio: “Proteína-B”).	143
Tabela III.1 - Reacções de oxidação química das CA, com nucleófilos de enxofre. Condições experimentais e resultados obtidos segundo os métodos gerais A (reacção com NaIO ₄ ou Sal de Frémy) e B (reacção com Ag ₂ O), descritos em III.7.2.	172
Tabela III.2 - Reacções de oxidação química de NADA com NAcHis e Imid. Condições experimentais e resultados obtidos segundo os métodos gerais A (reacção com NaIO ₄ ou Sal de Frémy) e B (reacção com Ag ₂ O), descritos em III.8.2.	177
Tabela III.3 - Condições experimentais nas reacções das CA com os aminoácidos valina, triptofano, <i>N</i> -acetil-lisina, serina e histidina.	179
Tabela III.4 - Condições experimentais nas reacções das CA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina, e 2'-desoxiadenina.	180
Tabela III.5 - Reacções da DA e NADA com o DNA.	184

Tabela III.6 - Ensaio de modificação da HSA por diferentes CA.	189
Tabela III.7 - Ensaio de modificação da HSA com NADA gerada com NaIO_4 .	189
Tabela III.8 - Condições experimentais nos ensaios de modificação de Hb e hhMb com NADA.	190

Índice de Esquemas

Esquema I.1 – Biossíntese da DA (1). ⁶	3
Esquema I.2 - Vias metabólicas da DA (1), (adaptado). ⁷	4
Esquema I.3 - Mecanismos de oxidação da DA (1), (adaptado). ¹⁴	5
Esquema I.4 - Reacção de oxidação enzimática da DA (1) com formação de conjugados de cisteína.	7
Esquema I.5 - Mecanismo proposto por Hungan <i>et al.</i> , para a formação de aductos em 5, (adaptado). ³⁵	7
Esquema I.6 - Mecanismo para a formação de conjugados de enxofre da DA (1) usando LPO. a) Formação do dímero (15), b) formação do aducto maioritário (12). ³¹	8
Esquema I.7 - Compostos isolados em reacções de oxidação electroquímica da DA (1), na presença de Cys. ²⁵	9
Esquema I.8 - Formação do composto DHBT-1 (19), um dos possíveis sulfidril-conjugados de DHBTs identificados na reacção de oxidação electroquímica da DA na presença de Cys, (adaptado). ²⁴	10
Esquema I.9 - Reacção de oxidação electroquímica da NADA (20) com formação de conjugados de NAcCys.	11
Esquema I.10 - Representação dos aductos em C6 e C2 obtidos na reacção de oxidação electroquímica da NADA (20) e NBAD (24) com os nucleófilos Imid e NAcHis, (adaptado). ^{37, 39}	12
Esquema I.11 - Reacção da DA (1) e NADA (20) com a dG e a Ade. ²⁰	13
Esquema I.12 - Mecanismo do metabolismos do MDMA (35), (adaptado). ^{49, 52}	15
Esquema I.13 - Representação das reacções de oxidação (enzimática/electroquímica) de diMeDA (37) e MeDA (38), seguida de adição dos bionucleófilos de enxofre (Cys, NAcCys e GSH).	16
Esquema I.14- Processo geral de modificação de uma proteína e formação de ligações covalentes entre a proteína e moléculas reactivas, xenobióticos ou seus metabolitos reactivos (Xen), (adaptado). ⁶⁰	18
Esquema I.15 - Formação de aductos de proteína através do resíduo de cisteína com 1,4-benzoquinona (47), (adaptado). ⁶⁰	18

Esquema I.16- Formação de aductos entre o resíduo de Cys34 da HSA e um metabolito electrófilo do Zileuton (48), (adaptado). ⁷⁰	20
Esquema I.17 - Formação do aducto LQQC(HNE)PF, (adaptado). ⁷⁶	20
Esquema I.18 - Reacção de modificação da HSA com o BDE (50), (adaptado). ⁷⁷	21
Esquema I.19 - Reacção de modificação da HSA com 12-mesiloxi-NVP (51), (adaptado). ⁷²	21
Esquema I.20- Metabolismo do BD (54). Abreviaturas: EH epóxido hidrolase; Val-Hb, hemoglobina modificada na valina terminal. ⁸⁴	23
Esquema I.21 - Formação de aductos da Hb com HMVK (56), (adaptado). ⁸⁴	24
Esquema I.22 - Aproximação possível para a identificação de resíduos de proteínas modificados.	32
Esquema II.1 – Reacção efectuada para preparação da NADA (20).	35
Esquema II.2 - Preparação da DA-Cbz (60).	37
Esquema II.3 - Síntese dos metabolitos do Ecstasy diMeDA (37), MeDA (38), HMMA (39) e HMA (40).	39
Esquema II.4 - Esquema geral de preparação de derivados sulfidrílo da DA, NADA e DA-Cbz.	41
Esquema II.5 - Mecanismo proposto para a formação de conjugados de enxofre de CA usando NaIO ₄ ou Sal de Frémy, exemplificado para a NADA (20) e a Cys, <i>via a)</i> Formação do dímero (15), <i>b)</i> formação do aducto maioritário (21).	54
Esquema II.6- Reacção da DA (1) com os nucleófilos de azoto, NAcHis e Imid.	56
Esquema II.7 - Reacção entre a NADA (20) e os nucleófilos de azoto NAcHis e Imid.	57
Esquema II.8 - Mecanismo de adição de Michael 1,4 entre a NAcHis e a NADA-quinona.	57
Esquema II.9 - Oxidação da NADA à respectiva o-quinona e isomerização à <i>para</i> -quinonametileno.	71
Esquema II.10 - Resumo da aproximação realizada para identificação dos resíduos modificados nas proteínas/péptido.	78
Esquema II.11 – Estruturas propostas para os iões fragmentos do aducto protonado da 5-Cys-NADA (76), a <i>m/z</i> 315.	123
Esquema II.12 - Representação esquemática da fragmentação proposta para o aducto protonado 6-His-NADA (88), a <i>m/z</i> 349.	125

Esquema II.13 - Representação esquemática da fragmentação do composto NADA, a m/z 196, $[MH]^+$.	126
Esquema II.14 - Representação esquemática do possível aducto da NADA com o Asp, com $[MH]^+$ m/z 327, e respectivo fragmento a m/z 310 e 264.	130
Esquema II.15 - Representação esquemática da fragmentação do aducto da NADA com o Asp, com $[MH]^+$ a m/z 327.	131
Esquema II.16- Representação esquemática da fragmentação do aducto da NADA com o Ala, com $[MH]^+$ a m/z 283.	134
Esquema II.17 - Estrutura proposta para o possível aducto da NADA com a Lys ou a Gln, a m/z 340, e correspondente fragmento.	136
Esquema II.18 - Representação dos aductos protonados dos compostos 5-Cys-MeDA (80) e 5-Cys-diMeDA (47) e respectivas quinonas.	137
Esquema II.19 - Representação da estrutura proposta para o aducto da MeDA com a Arg, e respectiva fragmentação.	138

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

a.a.	Aminoácido(s)
Ac	Acetilo
Ac ₂ O	Anidrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ade	Adenina
Ala	Alanina
ALDH	Aldeído desidrogenase
apoHb	<i>Apo</i> hemoglobin
apohhMb	<i>Apomyoglobin</i>
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BD	1,3-butadieno
BDD	3-buten-1,2-diol
BDE	Diol epóxido do benzeno
BMO	Butadieno monoepóxido
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA	Catecolamina
ca.	Cerca de
c.c.	Cromatografia em coluna
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.f.p.	Cromatografia em camada em camada fina preparativa
cf.	Confrontar
COMT	Catecol O-metiltransferase
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
Cys	Cisteína
d	Dupleto
dA	2'-Desoxiadenina
DA	Dopamina
Da	Dalton
DAQ	Dopamina quinona
dd	Duplo duplete
dG	2'-Desoxiguanosina

DHBT-1	Ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2 <i>H</i> -1,4-benzotiazina-3-carboxílico
DHBTs	Dihidrobenzotiazinas
diMeDA	<i>N</i> , α -dimetildopamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DNP	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DP	Doença de Parkinson
DTT	D,L-ditiotreitol
EBD	1,2-di-hidroxi-3,4-epoxibutano
Eq.	Equivalente
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
GSH	Glutationa
Gua	Guanina
h	Hora
Hb	<i>Human hemoglobin</i>
hhMb	<i>Horse heart Myoglobin</i>
HHPA	anidrido hexa-hidroftálico
His	Histidina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HMA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina
HMb	<i>Human Myoglobin</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multi Bond Correlation</i>
HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HMQC	<i>Heteronuclear Multi Quantum Correlation</i>
HMVK	Hidroximetilvinil cetona
HNE	4-hidroxi- <i>trans</i> -2-nonenal
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HVA	Ácido homovanílico
IAA	Iodoacetamida

<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -butilo
Ile	Isoleucina
Imid	Imidazole
isop	Isopropilideno
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LAP	<i>Leucine aminopeptidase</i>
LC-ESI-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry</i>
Leu	Leucina
LiAlH ₄	Hidreto de alumínio e lítio
LPO	<i>Lactoperoxidase</i>
Lys	Lisina
m	Multipeto
[M ⁺]	Ião molecular
MA	Adição de Michael
MALDI TOF-MS	<i>Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight-mass spectrometry</i>
MAO	Monoamina oxidase
Mb	<i>Myoglobin</i>
MDA	Metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeDA	α -Metildopamina
Met	Metionina
MS	Espectrometria de massa ou <i>Mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	Razão massa carga (espectrometria de massa)
NAcCys	<i>N</i> -acetil-cisteína
NAcHis	<i>N</i> -acetil-histidina
NADA	<i>N</i> -acetildopamina
NaIO ₄	Periodato de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
NBAD	<i>N</i> - β -alanildopamina
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Nuc	Nucleófilo

NVP	Nevirapina
ONE	4-oxo-2-nonenal
[O]	Oxidação
P450	Citocromo P450
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
p.f.	Ponto de fusão
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Py	Piridina
R_f	Coeficiente de arrastamento
ROS	Espécies de oxigénio reactivas
s	Singleto
SB	Base de Schiff
Ser	Serina
SN	Substância negra
sx	Sexteto
t	triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluroacético
THF	Tetra-hidrofurano
Thr	Treonina
TMS	Tetrametilsilano
t_R	Tempo de retenção
Trp	Triptofano
Ty	<i>Tyrosinase</i>
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
δ	Desvio químico em relação ao TMS
η	Rendimento
$\nu_{\text{máx}}$	Frequência do máximo de absorção em infravermelho
Val	Valina

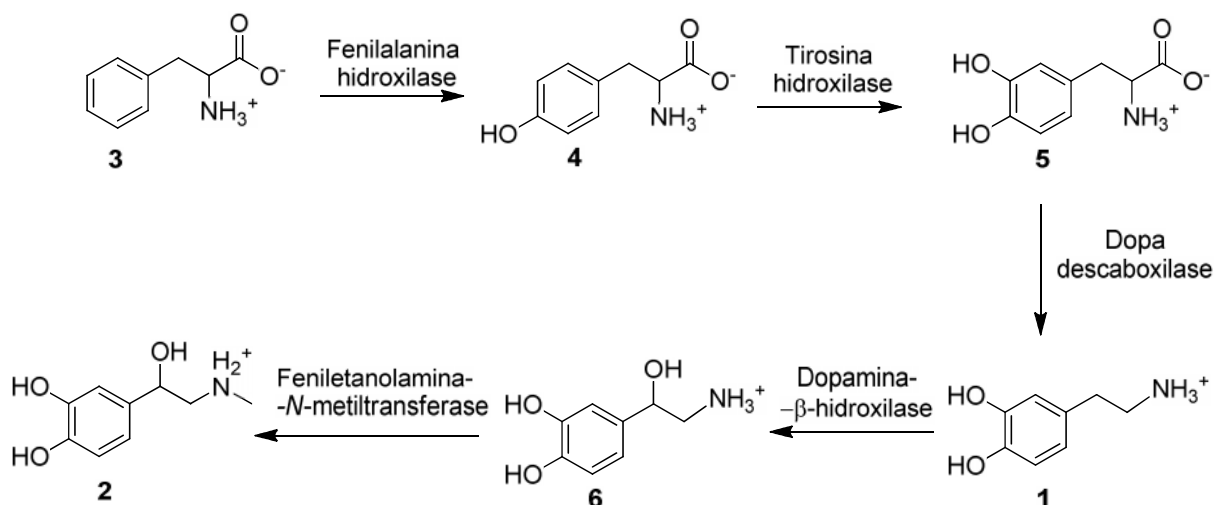
Capítulo I – Introdução

I.1 A Dopamina

I.1.1 Biossíntese, metabolismo e citotoxicidade da dopamina

A dopamina (**1**, DA) ocupa um lugar de destaque entre as catecolaminas (CA) mais conhecidas.¹ É um neurotransmissor do sistema nervoso central, envolvido na regulação do movimento, do comportamento e da emoção,^{2,3} actua como intermediário na biossíntese da adrenalina (**2**)³ (Esquema I.1), e encontra-se associada a doenças como a esquizofrenia e a doença de Parkinson (DP).^{4,5}

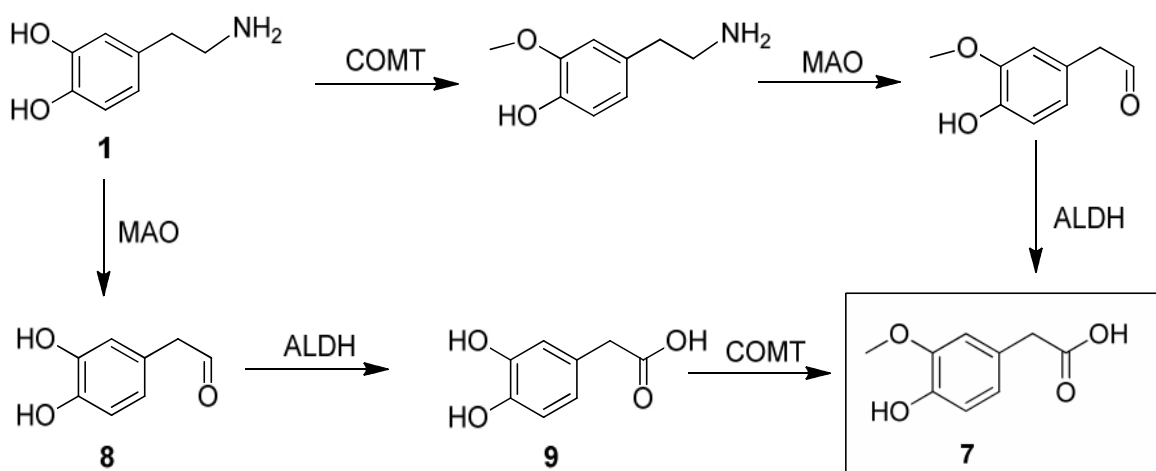
A biossíntese da DA (Esquema I.1), realiza-se a partir da fenilalanina (**3**). A fenilalanina sofre hidroxilação formando a tirosina (**4**), que pela acção da enzima tirosina hidroxilase dá origem ao composto 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, conhecido como L-DOPA ou levodopa (**5**). A actuação da enzima dopa descarboxilase é o último passo da síntese da DA. O composto **1** é precursor do neurotransmissor noradrenalina (**6**), que por sua vez dá origem à adrenalina. A DA é convertida em **6** pela enzima DA β -hidroxilase, que ao sofrer metilação pela enzima feniletanolamina *N*-metiltransferase origina **2**, (Esquema I.1).⁶



Esquema I.1 – Biossíntese da DA (1**).**⁶

Relativamente à metabolização da DA, esta pode formar enzimaticamente o ácido homovanílico (**7**, HVA) ou ser conjugada com a glutatona (GSH), após oxidação. O HVA pode ser produzido por duas vias diferentes, que se iniciam pela actuação das enzimas MAO (monoamina oxidase) ou COMT (catecol *O*-metiltransferase).

Pela acção da MAO a DA dá origem ao 3,4-dihidroxifenilacetaldeído (**8**), que pela acção da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) forma o correspondente ácido carboxílico, 3,4-dihidroxifenilacético (**9**), e que em seguida pela acção da enzima COMT produz HVA. A outra via metabólica da DA inicia-se pela acção da enzima COMT, em que a DA sofre O-metilação dando origem ao composto 3-O-metildopamina, que por sua vez pela acção das enzimas MAO e ALDH dá origem ao composto HVA.⁷



Esquema I.2 - Vias metabólicas da DA (**1**), (adaptado).⁷

A reacção de metabolização da DA pela MAO (Esquema I.2), leva à formação de espécies de oxigénio reactivas (ROS), como radicais superóxido e hidroxilo, que podem levar à degeneração de neurónios dopaminérgicos, a qual está muitas vezes relacionada com a idade ou com a DP. Por outro lado, a O-metilação da DA com COMT (Esquema I.2), pode ser um importante mecanismo de defesa antioxidante.^{8,9}

A metabolização da DA pela conjugação com a GSH tem adquirido elevada importância na investigação da DP. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum (sendo a primeira a doença de Alzheimer), e surge como a desordem do movimento que mais indivíduos afecta em todo o mundo. Estima-se que 1 a 2 % da população mundial com mais de 65 anos e 3 a 5 % com mais de 85 anos sofre de DP.¹⁰ A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada por rigidez, hipocinésia e tremor.¹¹ Estes sintomas estão relacionados com a deficiência de **1** no corpo estriado, que resulta de uma neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos (neurónios produtores do neurotransmissor **1**) na substância negra (SN) (Figura I.1).^{5, 11, 12}

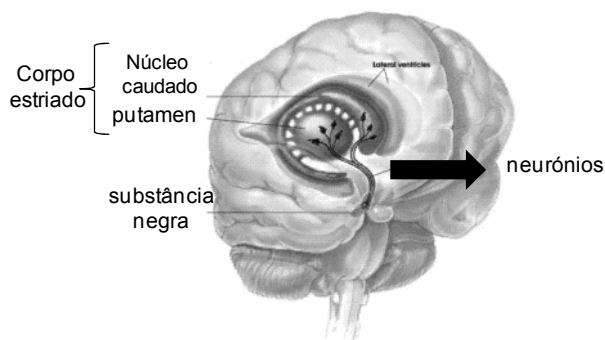
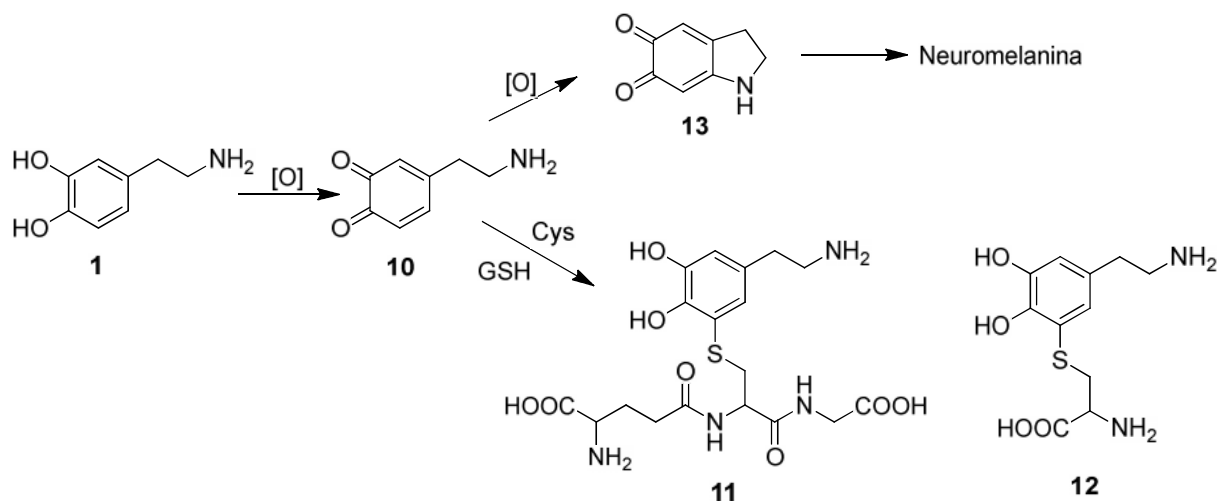


Figura I.1 - Figura de um cérebro humano, (adaptado).¹³

Uma combinação de factores foi proposta para explicar a neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos na DP, figurando entre eles a deficiência de GSH, e como consequência uma diminuição na sua capacidade antioxidante, a elevada concentração de ferro na SN, o aumento do *stress* oxidativo, e a formação de dopamina-quinona (**10**, DAQ) e subsequente formação de conjugados com a cisteína (Cys) e a GSH (Esquema I.3).^{3, 14-17} Contudo, a causa para a neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos continua por explicar.^{3, 17}

A formação de derivados tioéteres da DA assume particular relevância na DP, uma vez que foram identificados em concentrações elevadas no cérebro de pacientes que morreram da doença os compostos 5-S-glutatinonil-dopamina (**11**, 5-GSH-DA) e 5-S-cisteínil-dopamina (**12**, 5-Cys-DA), este último neurotóxico.^{3, 14, 18} A pH fisiológico, a DAQ pode reagir com grupos sulfidrílo, que podem estar na forma de aminoácidos (a.a.) livres (Cys), péptidos (GSH) ou proteínas. A adição nucleófila ocorre maioritariamente na posição 5 do anel aromático da DA, dando origem aos compostos **11** e **12**, (Esquema I.3).^{3, 14} Jameson *et al.* verificaram que a presença de Cys inibe completamente a ciclização intramolecular da DAQ para o aminocromo, (**13**).¹⁹



Esquema I.3 - Mecanismos de oxidação da DA (**1**), (adaptado).¹⁴

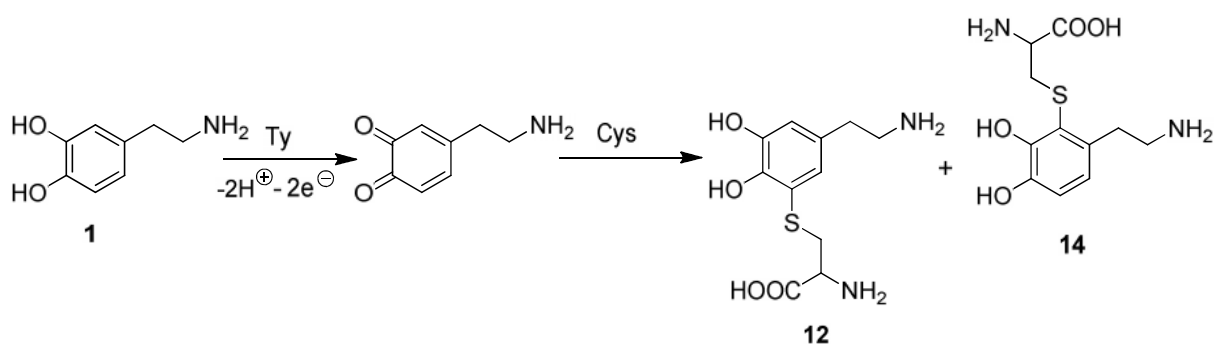
Mutações provocadas pela DA no DNA, podem também estar relacionadas com desordens neurodegenerativas, como a DP. A formação de aductos da DA com o DNA foi investigado por Cavalieri *et al.*²⁰

A elevada toxicidade da DA foi demonstrada em estudos *in vitro* realizados por Graham *et al.*,^{21, 22} e mais tarde em estudos *in vivo* executados por Hastings *et al.*²³ No modelo investigado pelos autores foi demonstrado que a citotoxicidade induzida pela DA está associada a modificação de proteínas pela DAQ e consequente formação de conjugados de cisteína.²³ Para que estas modificações de proteínas ou DNA ocorram é necessária a oxidação da DA à respectiva quinona (Esquema I.3), o que pode acontecer espontaneamente ou por reacções com enzimas (*tyrosinase*), ou com metais (cobre, ferro).^{3, 14} As quinonas são espécies altamente reactivas, e devido à formação do radical semi-quinona podem entrar no ciclo redox, levando à formação de ROS tais como anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($^{\bullet}OH$) ou peróxido de hidrogénio, que podem levar à neurodegeneração dos neurónios dopaminérgicos.¹⁶

I.1.2 Preparação de conjugados de enxofre da dopamina

A síntese de conjugados da DA com nucleófilos de enxofre, Cys, *N*-acetil-cisteína (NACys) e GSH, têm envolvido maioritariamente reacções de oxidação electroquímica^{11, 24-28} e enzimática^{18, 29-31} da DA. Uma enzima frequentemente utilizada, é a *tyrosinase*.^{18, 29-31} É uma enzima de cobre que catalisa duas reacções distintas na biossíntese da melanina, a hidroxilação e a oxidação da tirosina,³² e foi identificada na substância negra de humanos.¹²

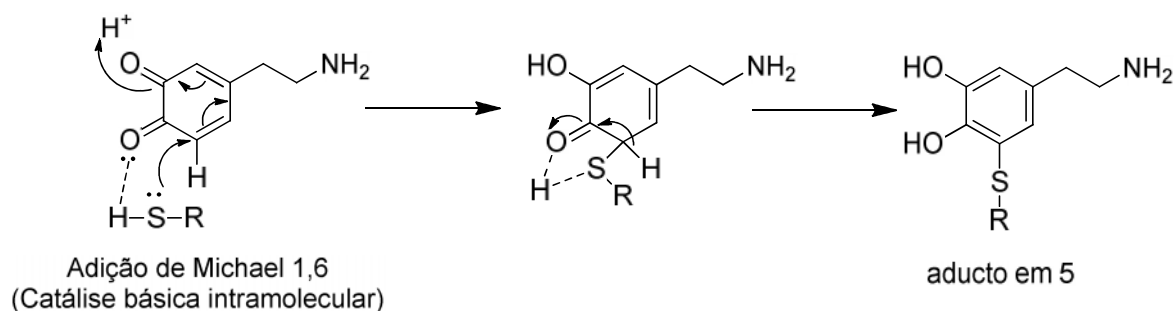
A oxidação da DA à DAQ é um processo de transferência de dois electrões, que pode ocorrer num único passo, ou em duas reacções de oxidação consecutivas com transferência de um electrão. Nas reacções com *tyrosinase* a oxidação da DA à respectiva *o*-quinona ocorre num único passo e de seguida adiciona-se o bionucleófilo de enxofre, por exemplo Cys (Esquema I.4). Consequentemente, duas reacções competem: a reacção de ciclização intramolecular (com o grupo amino da DA) e a reacção intermolecular com o nucleófilo de enxofre.³¹ Tse *et al.*, verificaram que a Cys e a GSH competem favoravelmente com a ciclização intramolecular, reagindo mais rapidamente (três ordens de magnitude superior) com a DAQ e formando os respectivos tio-conjugados (Esquema I.4).³³ Uma vez que a actividade da *tyrosinase* é limitada à DA e os tióis como a Cys inibem a enzima, não se verificam reacções de oxidação sucessiva.³⁴



Esquema I.4 - Reacção de oxidação enzimática da DA (1) com formação de conjugados de cisteína.

Deste modo, utilizando *tyrosinase* como oxidante e um excesso de nucleófilo de enxofre, obtém-se os respectivos mono-aductos em 2 (14, 2-Cys-DA) e em 5 (12), (Esquema I.4).^{18, 29-31} Verifica-se que a reacção é regioselectiva, sendo o composto maioritário o aducto em 5.

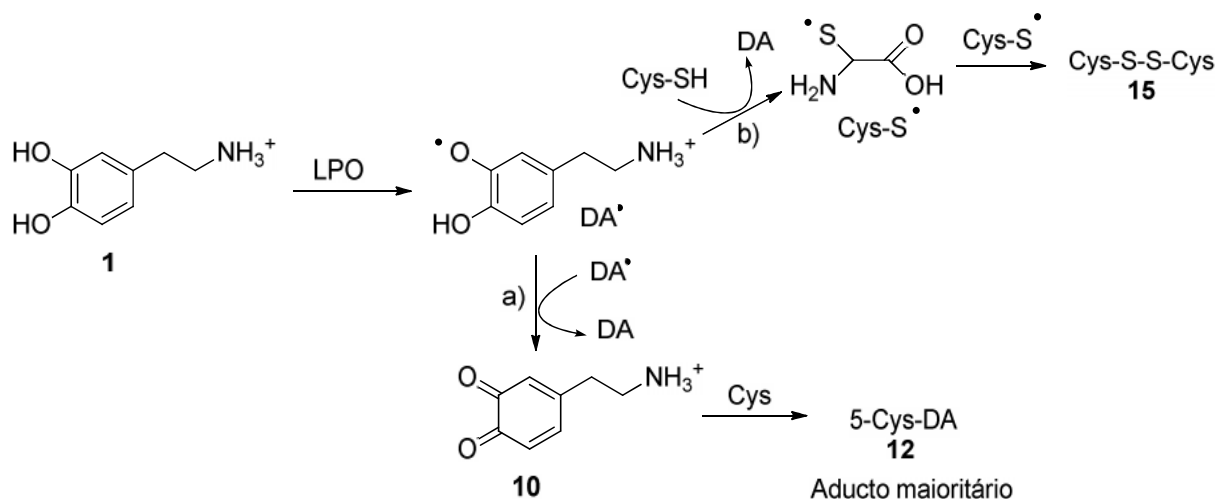
Huang *et al.*, propuseram um mecanismo onde explicam que a preferência do ataque nucleófilo ao C5 da DAQ resulta de uma reacção de adição de Michael 1,6, seguida de uma catálise básica intramolecular (Esquema I.5). Ou seja, na presença de nucleófilos de enxofre com um protão no centro nucleófilo, (SH-), o grupo carbonilo na posição C4 da DAQ pode formar uma ligação de hidrogénio com o nucleófilo aquando o ataque na posição 5 da DAQ (Esquema I.5). A catálise básica intramolecular aumenta a nucleofilicidade e facilita a formação de aductos em C5.³⁵ Também Jameson e colaboradores propõem um mecanismo idêntico.¹⁹



Esquema I.5 - Mecanismo proposto por Hungan *et al.*, para a formação de aductos em 5, (adaptado).³⁵

Nicolis *et al.*, investigaram a formação de conjugados sulfidrílo (GSH e NAcCys) da DA, utilizando como oxidantes *tyrosinase* e *lactoperoxidase* (LPO), e observaram que os oxidantes seguem mecanismos diferentes para a formação da DAQ. Independentemente do oxidante utilizado, foram isolados e caracterizados os respectivos aductos em 2 e em 5.

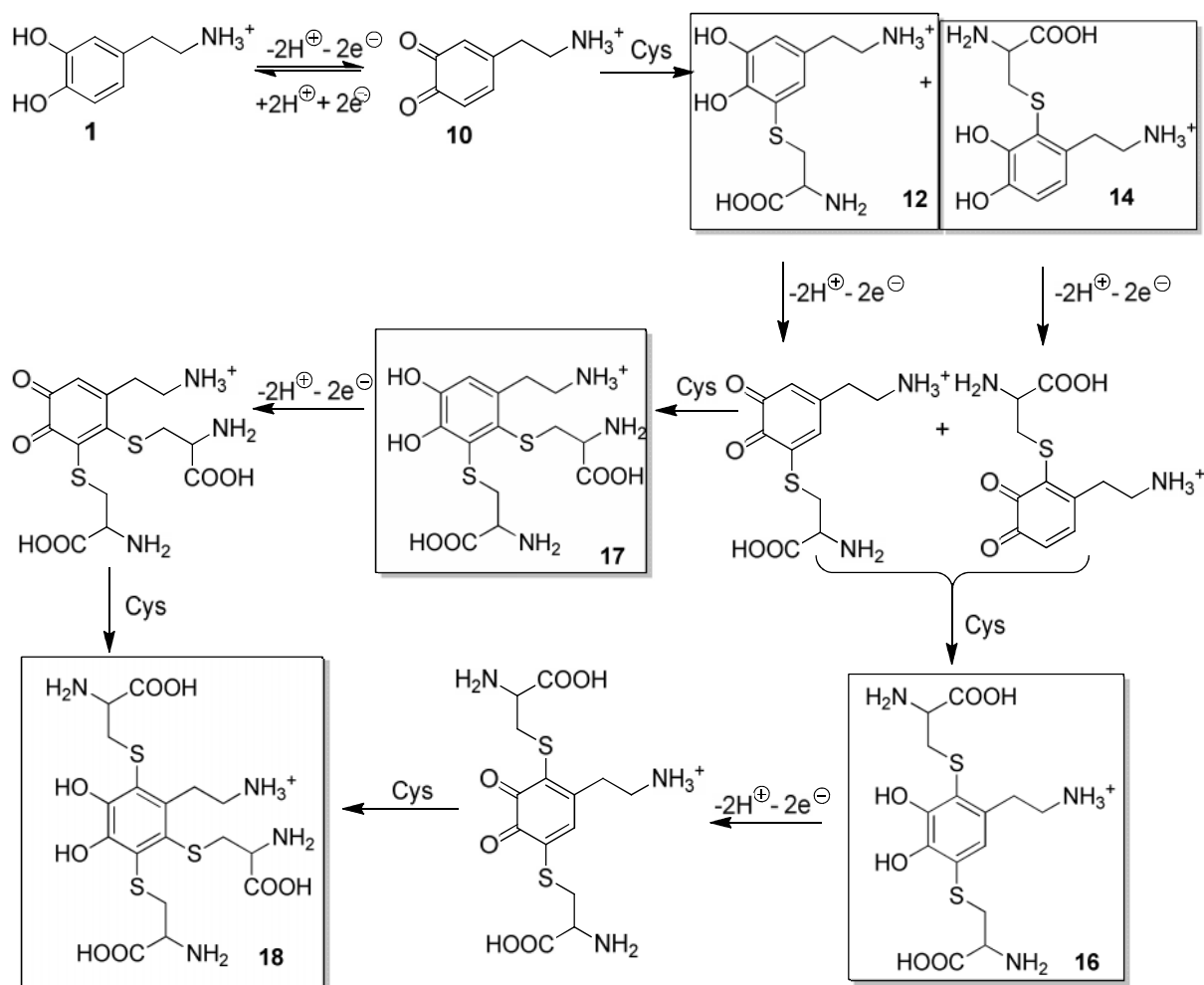
No caso da GSH foi ainda caracterizado o respectivo aducto em 6, 6-glutationil-dopamina (6-GSH-DA). No entanto, utilizando LPO foram ainda identificados os dímeros dos nucleófilos de enxofre utilizados, que segundo os autores são uma indicação de que a reacção segue um mecanismo de oxidação radicalar com formação da semi-quinona (Esquema I.6). Deste modo, para a LPO a formação da DAQ ocorre em dois passos com transferência sucessiva de um electrão.³¹ Como exemplo apresentamos a reacção da DA com Cys, tendo como produtos o aducto em 5 (**12**) e o dímero da Cys (**15**).



Esquema I.6 - Mecanismo para a formação de conjugados de enxofre da DA (**1**) usando LPO. a) Formação do dímero (**15**), b) formação do aducto maioritário (**12**).³¹

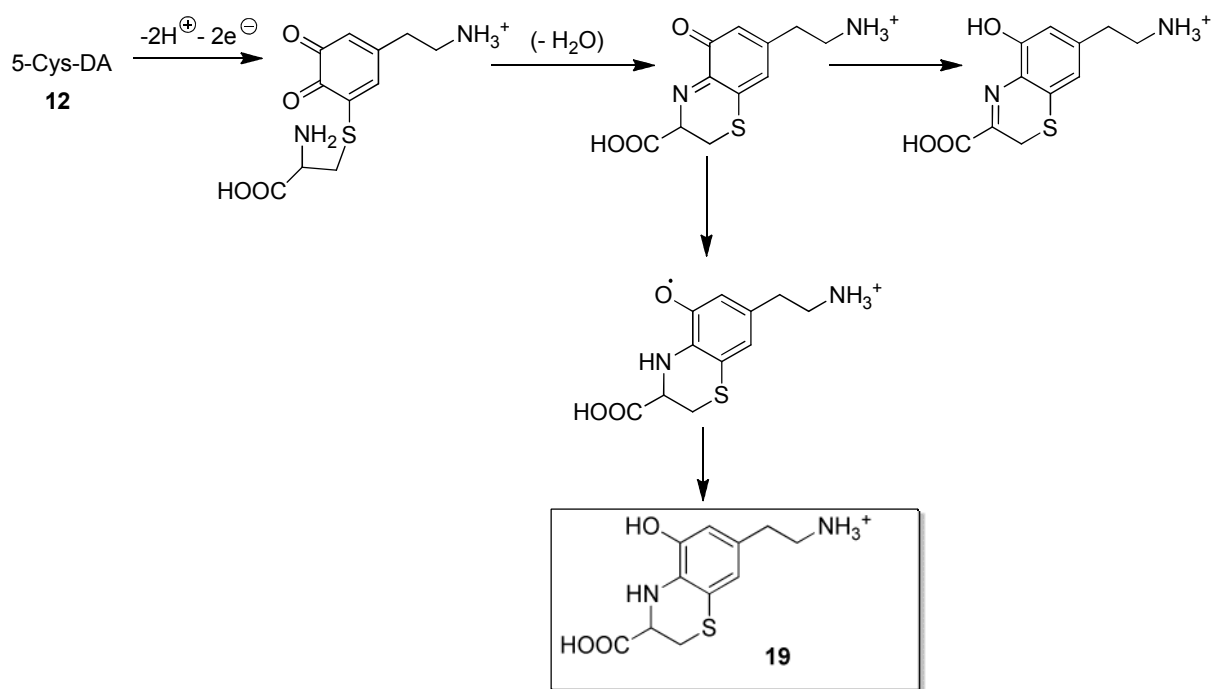
Levadas a cabo por vários autores, as reacções de oxidação electroquímica da DA com bionucleófilos de enxofre, Cys, NAcCys ou GSH, apresentam um perfil reaccional bastante complexo, pelo facto de os aductos em 5 e em 2 serem mais facilmente oxidados à respectiva quinona do que a DA à DAQ, permitindo a formação de bis aductos (aducto em 2,5 ou em 5,6). Duas metodologias distintas foram realizadas pelos autores para a síntese de sulfidril-conjugados da DA. Por um lado, realizaram a oxidação electroquímica da DA à DAQ, adicionando de seguida o bionucleófilo de enxofre. Os compostos isolados foram os correspondentes aductos em 2, 5 (maioritário) e 6 ou 2,5 (minoritário).²⁴⁻²⁷ Por outro lado, a oxidação da DA à respectiva DAQ foi realizada na presença do nucleófilo de enxofre, e neste caso o número de aductos isolados aumentou consideravelmente. Para além dos mono-aductos em 2 e 5 (maioritário), os autores isolaram bis-aductos (em 2,5 e em 5,6), tris-aductos (em 2,5,6) e, no caso da GSH, um tetra-aducto (2,5,6,7).^{11, 24, 25, 28} No Esquema I.7 apresenta-se um exemplo dos aductos isolados numa reacção de oxidação electroquímica da DA na presença de cisteína.

A saber, os mono-aductos **12** e **14**, os bis-aductos 2,5-S,S-di-cisteínil-dopamina (**16**, 2,5-Cys-DA), 5,6-S,S-di-cisteínil-dopamina (**17**, 6,5-Cys-DA), e o tri-aducto 2,5,6-S,S,S-tri-cisteínil-dopamina (**18**, 2,5,6-Cys-DA).²⁵



Esquema I.7 - Compostos isolados em reacções de oxidação electroquímica da DA (**1**), na presença de Cys.²⁵

De salientar que na presença de Cys a complexidade da mistura de aductos aumenta consideravelmente, devido à possibilidade de formação de sulfidril-conjugados de dihidro-benzotiazinas (DHBTs). No Esquema I.8 está representada a formação de um possível aducto, o composto neurotóxico, o ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3-carboxílico (**19**, DHBT-1).^{11, 24}



Esquema I.8 - Formação do composto DHBT-1 (**19**), um dos possíveis sulfidril-conjugados de DHBTs identificados na reacção de oxidação electroquímica da DA na presença de Cys, (adaptado).²⁴

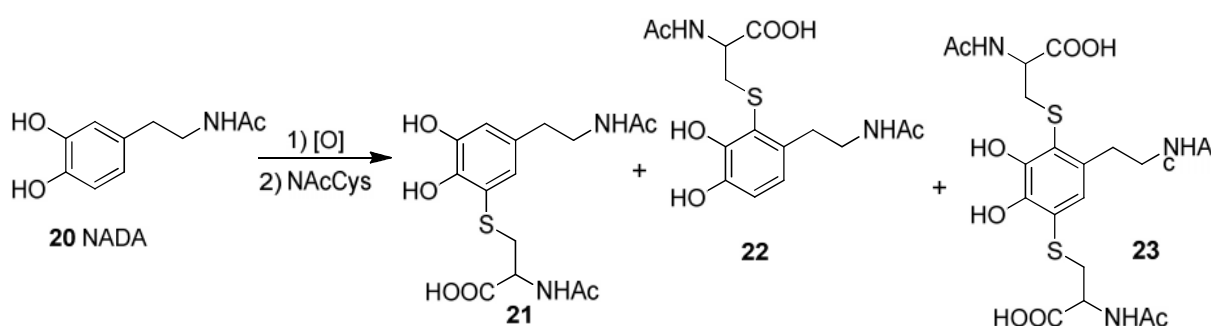
Além dos oxidantes acima expostos, outros têm sido utilizados para a reacção de oxidação da DA à DAQ. Vauzour *et al.*, utilizaram peroxinitrito ($ONOO^-$) para oxidar a DA à DAQ na presença de cisteína, e isolaram os compostos 2-Cys-DA (**14**), 5-Cys-DA (**12**) e DHBT-1 (**19**).¹⁴ Shen e colaboradores utilizaram ferro (II/III) e manganês (II) para catalisar a autooxidação da DA na presença de Cys.³⁶

I.2 A *N*-acetildopamina

A *N*-acetildopamina (**20**, NADA) foi identificada em insectos, estando envolvida no processo de endurecimento da cutícula.^{37, 38} É frequentemente utilizada em estudos que visam elucidar possíveis reacções que ocorrem durante o processo de endurecimento da cutícula, nomeadamente a reacção da NADA-quinona com compostos modelo presentes nas proteínas da cutícula, imidazole (Imid) e *N*-acetil-histidina (NAcHis).^{37, 39} Produtos resultantes da conjugação de NADA com bionucleófilos de enxofre foram identificados nos rins e na urina de humanos.⁴⁰ Além disso, a NADA é frequentemente utilizada como composto modelo da DA em reacções com biomacromoléculas.^{20, 41}

I.2.1 Preparação de conjugados de enxofre da *N*-acetildopamina

Na literatura por nós consultada sobre a síntese de conjugados de bionucleófilos de enxofre (Cys, NAcCys e GSH) com NADA observámos que só a NAcCys tinha sido investigada por Huang *et al.*. Os autores realizaram a oxidação electroquímica da NADA seguida da adição de NAcCys, e isolaram e caracterizaram os compostos 5-*S*-(*N*-acetil-cisteínil)-*N*-acetildopamina (**21**, 5-NAcCys-NADA), 2-*S*-(*N*-acetil-cisteínil)-*N*-acetildopamina (**22**, 2-NAcCys-NADA), e 2,5-*S,S*-di-(*N*-acetil-cisteínil)-*N*-acetildopamina (**23**, 2,5-di-NAcCys-NADA), (Esquema I.9). À semelhança do descrito para as reacções da DA, a reacção da NADA com a NAcCys é regioselectiva, dando origem maioritariamente ao aducto em C5.³⁵

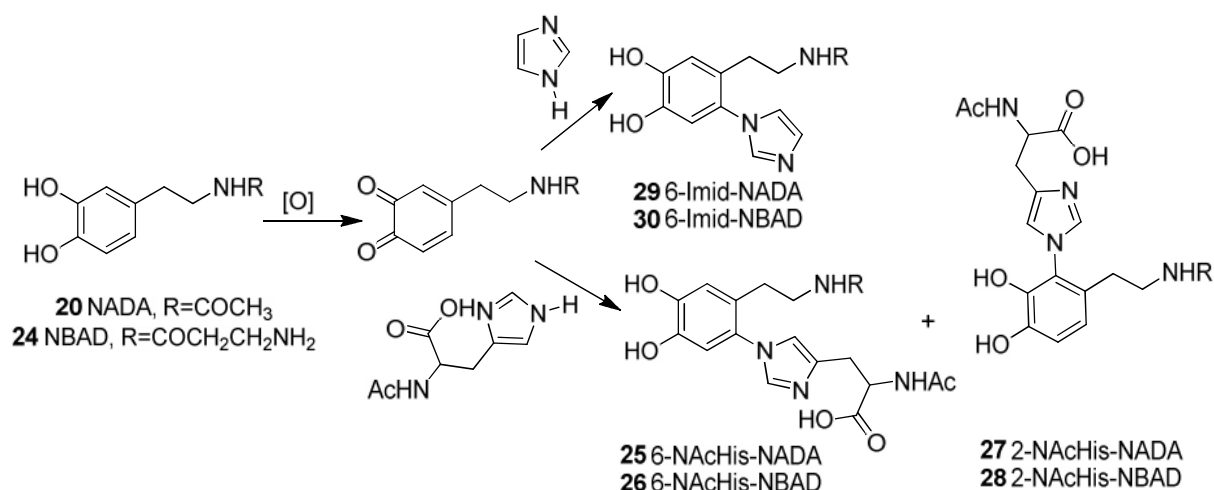


Esquema I.9 - Reacção de oxidação electroquímica da NADA (**20**) com formação de conjugados de NAcCys.

I.2.2 Preparação de conjugados de azoto de catecolaminas

A reacção de catecolamina-quinonas com bionucleófilos de azoto é pouco mencionada na literatura, possivelmente devido à fraca nucleofilicidade destes compostos. Xu³⁹ e Huang *et al.*,³⁷ descreveram a reacção da quinona da NADA e da *N*-β-alanildopamina (**24**, NBAD), geradas por oxidação electroquímica, com dois centros de azoto, o imidazole (Imid) e a *N*-acetil-histidina (NAcHis). Estes nucleófilos são utilizados como modelos de proteínas que contêm resíduos de histidina reactivos. No caso da NAcHis os autores referem o aducto em C6 como o composto maioritário, resultado de uma adição de Michael 1,4 da NAcHis à respectiva quinona, a saber 6-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-acetildopamina (**25**, 6-NAcH-NADA) e 6-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-β-alanildopamina (**26**, 6-NAcH-NBAD).

Em menores quantidades, foi também isolado e caracterizado o aducto em C2, 2-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-acetildopamina (**27**, 2-NAcH-NADA) e 2-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-β-alanildopamina (**28**, 2-NAcH-NBAD), formado a partir de uma adição de Michael 1,6 da NAcHis à quinona (Esquema I.10). Relativamente ao Imid, foi identificado como único produto da reacção o composto em C6, 6-(*N*-imidazol-*N*1'-il)-*N*-acetildopamina (**29**, 6-Imid-NADA) e 6-(*N*-imidazol-*N*1'-il)-*N*-β-alanildopamina (**30**, 6-Imid-NBAD), (Esquema I.10).^{37, 39}



Esquema I.10 - Representação dos aductos em C6 e C2 obtidos na reacção de oxidação electroquímica da NADA (**20**) e NBAD (**24**) com os nucleófilos Imid e NAcHis, (adaptado).^{37, 39}

I.3 Formação de aductos de DNA

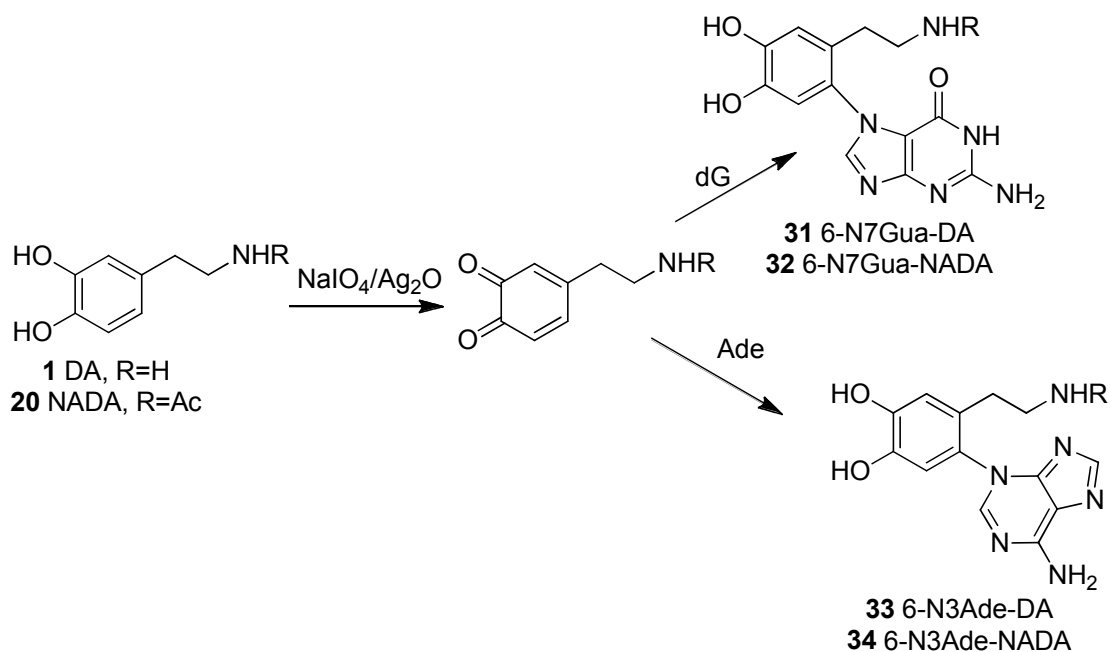
I.3.1 Formação de aductos despurinantes de DNA com as *orto*-quinonas da DA e NADA

Cavallieri *et al.*, investigaram a formação de mutações no DNA originadas pela DA que pudessem provocar desordens neurodegenerativas, como a DP. Deste modo, para a obtenção de padrões bem caracterizados do DNA, reagiram a DAQ com a 2'-desoxiguanosina (dG) e a adenina (Ade) e posteriormente com o DNA. Devido à maior facilidade de ocorrerem as reacções de ciclização intramolecular na DAQ, os autores investigaram também a NADA.²⁰

A metodologia realizada pelos autores para a síntese dos padrões com a dG e a Ade, envolveu a oxidação química com periodato de sódio (NaIO_4) (0,5 eq.) ou com óxido de prata (Ag_2O) (8,3 eq.) da DA e da NADA à respectiva quinona, seguida da adição do nucleófilo. Foram obtidos com rendimentos moderados os aductos despurinantes da dG, no N-7 da Guanina (Gua), a saber 6-N7Gua-DA (**31**) e 6-N7Gua-NADA (**32**), e os produtos N-3 da Ade [6-N3Ade-DA (**33**), 6-N3Ade-NADA (**34**)], (Tabela I.1 e Esquema I.11), que resultam de uma adição de Michael 1,4 ao C6 da CA. Salienta-se que no caso da dG ocorreu a perda da molécula de desoxiribose. Cavalieri e colaboradores tentaram a obtenção de aductos com a 2'-desoxiadenina (dA), a desoxicitidina e a desoxitimidina, mas os resultados foram infrutíferos.²⁰

Tabela I.1 – Reacções da DA e NADA com dG e Ade, aductos obtidos e rendimentos.²⁰

Aductos	Rendimento (η %)	Rendimento (η %)
	NaIO_4	Ag_2O
6-N7Gua-DA	46	-
6-N3Ade-DA	40	-
6-N7Gua-NADA	58	60
6-N3Ade-NADA	51	-



Esquema I.11 - Reacção da DA (**1**) e NADA (**20**) com a dG e a Ade.²⁰

Relativamente às reacções levadas a cabo por Cavalieri *et al.*, com o DNA, onde utilizaram *tyrosinase* para a oxidação da DA à DAQ, foram isolados os aductos despurinantes da dG e da dA, N-7Gua e N-3Ade, respectivamente, formados *via* adição de Michael 1,4.²⁰ Os autores sugerem que as mutações provocadas pela DA no DNA podem estar relacionadas com o processo inicial da DP ou de outras desordens neurodegenerativas.^{20, 42}

Recentemente Cavalieri *et al.*, estudaram a reacção da NADA com a dG e com o DNA. No primeiro caso observaram por ESI a formação do composto 6-N7dG-NADA precursor do aducto 6-N7Gua-NADA (**32**). No segundo caso observaram os aductos despurinantes 6-N7Gua-NADA (**32**) e 6-N3Ade-NADA (**34**). Os autores sugerem que a formação destes aductos pode estar associada a doenças neurodegenerativas ou a processos iniciais de cancro.⁴¹

I.4 Os metabolitos do *Ecstasy*

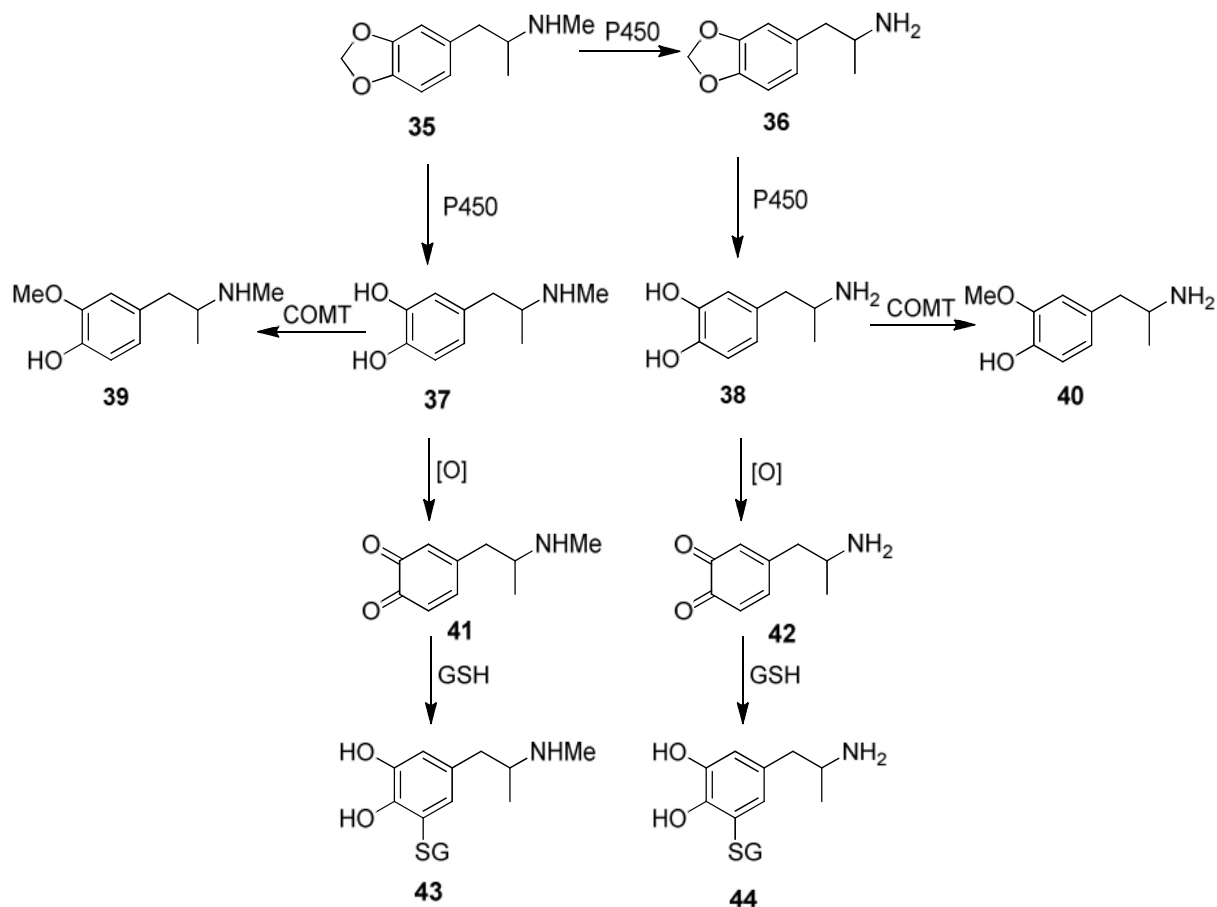
I.4.1 Síntese e citotoxicidade dos metabolitos do *Ecstasy*

O *Ecstasy* (**35**, 3,4-metilenodioximetanfetamina, MDMA) é uma droga de abuso que pertence à classe das anfetaminas, sendo alucinogénica e conhecida por provocar danos cerebrais.⁴³ A metilenodioxianfetamina (**36**, MDA) é um metabolito da MDMA, sendo também utilizada como droga de abuso.⁴⁴ Tanto o MDMA como o MDA apresentam efeitos estimulantes sobre o sistema nervoso central, provocam uma sensação de bem-estar e de euforia e aumentam a sociabilidade, daí serem drogas tão populares.^{45, 46} No entanto, provocam danos para a saúde, como arritmias cardíacas, convulsões, hipertermia, falta de apetite e falhas renais.⁴⁶⁻⁴⁸

A injeção directa dos compostos **35** e **36** no cérebro não reproduziu efeitos neurotóxicos, sugerindo que a sua neurotoxicidade está relacionada com o seu metabolismo.^{43, 49, 50}

A metabolização do MDMA envolve a *N*-desmetilação para formar o MDA e a *O*-desprotecção de ambas as moléculas, para originar os compostos *N*, α -dimetildopamina (**37**, diMeDA) e α -metildopamina (**38**, MeDA), respectivamente (Esquema I.12). Pode ainda gerar espécies reactivas, uma vez que os catecóis MeDA e diMeDA podem sofrer oxidação, dando origem às respectivas *o*-quinonas. Estas podem formar aductos com a GSH ou outros tióis (Esquema I.12).^{43, 44, 49-51}

Por outro lado, a diMeDA e a MeDA podem sofrer O-metilação pela COMT, para formar os compostos 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (**39**, HMMA) e 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (**40**, HMA), respectivamente (Esquema I.12).^{51, 52}



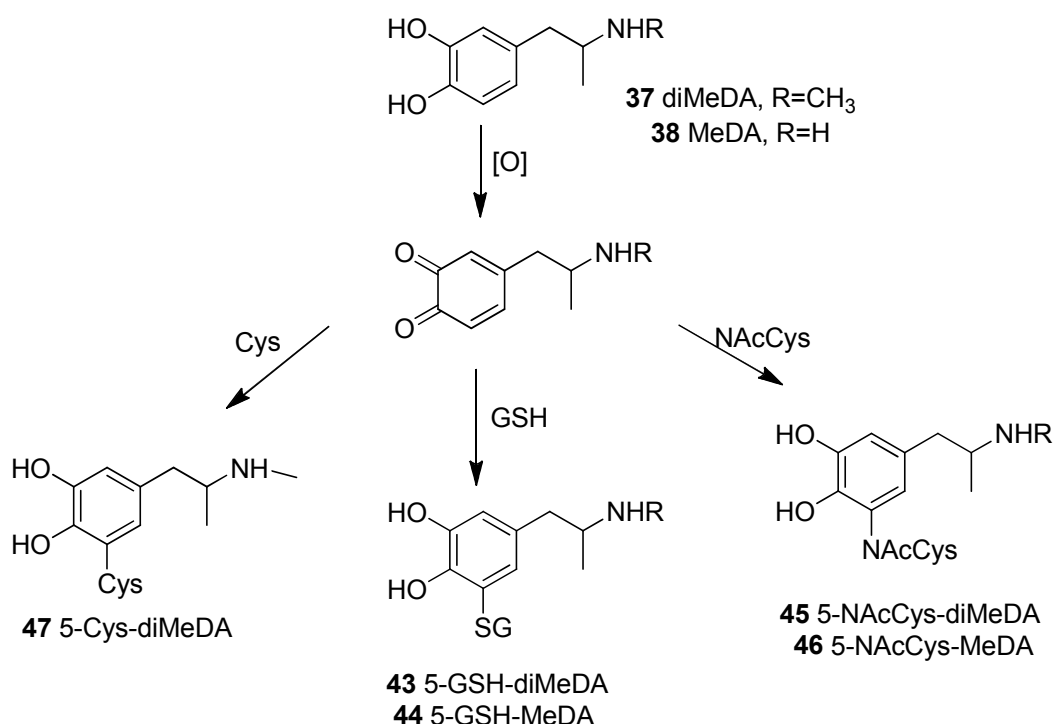
Esquema I.12 - Mecanismo do metabolismo do MDMA (**35**), (adaptado).^{49, 52}

Na presença de GSH as o-quinonas da diMeDA (**41**) e MeDA (**42**) formam os respectivos conjugados de enxofre, 5-GSH-diMeDA (**43**) e 5-GSH-MeDA (**44**), (Esquema I.12), que podem sofrer oxidação e nova adição nucleófila por parte da GSH, dando origem a bis aductos. Continuam por elucidar os mecanismos subjacentes à neurotoxicidade induzida pelo MDMA, tendo sido, no entanto, sugerido que a formação de espécies reactivas no seu metabolismo esteja relacionada com a sua neurotoxicidade.^{43, 47}

I.4.2 Reacções com os metabolitos do *Ecstasy*, MeDA e diMeDA

A preparação de tio-conjugados de Cys, NAcCys e GSH dos metabolitos do *Ecstasy* diMeDA (**37**) e MeDA (**38**) tem envolvido, maioritariamente, reacções de oxidação enzimática (*tyrosinase*).^{43, 44, 49-51, 53, 54} No entanto, também existem alguns exemplos de reacções de oxidação electroquímica destas CA, (Esquema I.13).^{54, 55} Nas reacções de oxidação enzimática de **37** e **38** com adição dos nucleófilos GSH e NAcCys, quase todos os autores apresentam, como único produto da reacção o respectivo aducto em 5, a saber 5-S-glutathionil-*N*, α -dimetildopamina (**43**, 5-GSH-diMeDA), 5-S-glutathionil- α -metildopamina (**44**, 5-GSH-MeDA), 5-S-(*N*-acetilcisteínil)-*N*, α -dimetildopamina (**45**, 5-NAcCys-diMeDA), e 5-S-(*N*-acetilcisteínil)- α -metildopamina (**46**, 5-NAcCys-MeDA), (Esquema I.13).^{43, 49-51, 54} Segundo procedimento semelhante, Macedo *et al.* isolaram além dos compostos apresentados os respectivos aductos em 2.⁴⁴

Relativamente às reacções de oxidação electroquímica dos metabolitos, após a formação da respectiva *o*-quinona foram adicionados os bionucleófilos. Segundo a metodologia descrita, Pizarro e colaboradores oxidaram a diMeDA e adicionaram GSH ou NAcCys, e isolaram os correspondentes aductos em 5 (maioritário) e em 2,5.⁵⁴ Felim *et al.*, segundo o mesmo procedimento e utilizando os bionucleófilos GSH, NAcCys e Cys recolheu com bons rendimentos os respectivos aductos em 5.⁵⁵



Esquema I.13 - Representação das reacções de oxidação (enzimática/electroquímica) de diMeDA (**37**) e MeDA (**38**), seguida de adição dos bionucleófilos de enxofre (Cys, NAcCys e GSH).

I.5 Aductos de proteínas como biomarcadores de toxicidade

A modificação de proteínas por xenobióticos foi referenciada pela primeira vez nos anos 40, por Elizabeth e James Miller; no entanto, só nos anos 80 com os estudos de Ehrenberg, Tannenbaum e Farmer sobre aductos da hemoglobina como biomarcadores de exposição cancerígena é que aumentou o interesse na sua investigação.⁵⁶ Devido às limitações na tecnologia disponível, a caracterização de aductos de proteínas tornava-se difícil. Com o aparecimento de equipamento de espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI) (em 1984–1988) e com desorção e ionização a Laser assistida por matriz (MALDI) em 1988,^{56, 57} técnicas que permitiram trabalhar a massas superiores a 100 kDa e tiveram um enorme impacto sobre o uso da espectrometria de massa na biologia e nas ciências da vida, a identificação dos alvos dos electrófilos nas proteínas tornou-se possível.^{58, 59} Os avanços tecnológicos em espectrometria de massa, em conjunto com o desenvolvimento das técnicas analíticas de identificação e digestão de proteínas, permitiram a rápida identificação de proteínas nativas e modificadas por compostos electrófilos.

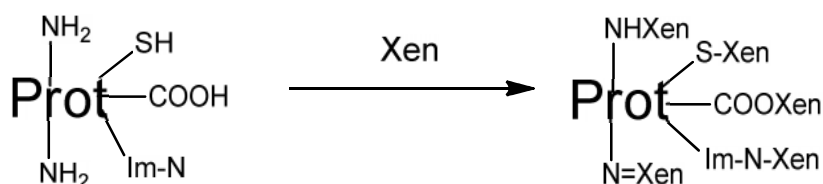
Ao longo de trinta anos a investigação relacionada com a formação de aductos covalentes de biomacromoléculas com espécies reactivas baseou-se na aplicação destes compostos como: (i) indicadores do nível médio de exposição de indivíduos a determinados produtos químicos, endógenos ou exógenos, (ii) indicadores quantitativos da actividade metabólica de diferentes compostos a produtos tóxicos, capazes de danificar o DNA ou proteínas, e (iii) indicadores que relacionem o grau de modificação de determinada proteína com a continuidade das suas funções biológicas e com o dano específico provocado à saúde humana.⁶⁰

O espectro de aplicação dos aductos de proteínas é muito vasto, sendo a toxicologia a área onde têm sido aplicados com maior frequência.⁶⁰ A formação de aductos do tipo fármaco-proteína pode estar relacionada com o mecanismo de toxicidade causado por inúmeros fármacos. A monitorização destes aductos permite estabelecer uma relação dose-toxicidade, assim como ajudar no diagnóstico de várias doenças, assumindo assim, uma importância ao nível clínico, farmacológico e toxicológico.⁶¹

A medicina e a toxicologia utilizam frequentemente biomarcadores para o diagnóstico de inúmeras doenças.⁶² Os biomarcadores de exposição são usados para controlar os efeitos e/ou avaliar os riscos causados por xenobióticos. A análise *in vivo* de espécies electrófilas reactivas que apresentam períodos de vida muito curtos não é fácil. Assim, o uso de biomarcadores torna possível a análise destes electrófilos, ao reagirem com biomacromoléculas (proteínas e DNA) e formarem aductos estáveis que permaneçam numa concentração significativa nos tecidos.^{57, 63} Entre as proteínas descritas como bons biomarcadores estão a hemoglobina humana (Hb) e a albumina de soro humano (HSA), uma vez que estão acessí-

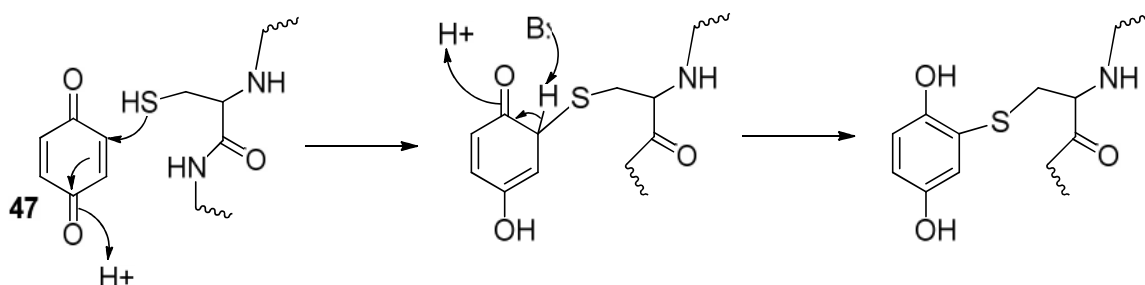
veis em grandes quantidades, levam à formação de aductos quimicamente estáveis e têm *turnovers* conhecidos.⁵⁷ Além da Hb outra proteína globular muitas vezes usada como biomarcador é a *horse heart myoglobin*, (hhMb).³¹

A formação de aductos de proteínas pode estar relacionada com a patogénese de várias doenças degenerativas, como a diabetes, a arteriosclerose e a doença de Alzheimer.^{60, 64} Os aductos de proteínas formam-se através de ligações covalentes entre uma espécie electrófila reactiva e um grupo nucleófilico da proteína, que pode ser o *N*-terminal de um grupo amino; o grupo tiol da cadeia lateral da cisteína; os átomos de azoto do imidazole da histidina; os grupos amino e guanidino da cadeia lateral da lisina e arginina respectivamente; os grupos carboxílicos da cadeia lateral do ácido aspártico e glutâmico e o anel fenólico da tirosina (Esquema I.14).⁶⁰



Esquema I.14- Processo geral de modificação de uma proteína e formação de ligações covalentes entre a proteína e moléculas reactivas, xenobióticos ou seus metabolitos reactivos (Xen), (adaptado).⁶⁰

Um tipo de electrófilo com relevância toxicológica e susceptível de reagir com proteínas são os carbonilos α,β -insaturados, entre eles as quinonas geradas por oxidação de fenóis. As diversas quinonas reagem através de reacções de adição de Michael com grupos nucleófilos das proteínas ou péptidos.⁶⁰ Alguns estudos demonstram a reactividade de variadas quinonas, por exemplo, a 1,4-benzoquinona (**47**), com proteínas e péptidos modelo contendo cisteínas (Esquema I.15).⁶⁵⁻⁶⁸



Esquema I.15 - Formação de aductos de proteína através do resíduo de cisteína com 1,4-benzoquinona (**47**), (adaptado).⁶⁰

I.5.1 A HSA como biomolécula de monitorização de espécies electrófilas reactivas

A HSA é uma proteína muito bem caracterizada, com 585 resíduos de a.a. e 66 kDa. É a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, apresentando uma concentração fisiológica de $600 \mu\text{M}$ (40 mg/mL), o que representa cerca de 60% do número total de proteínas numa amostra de plasma.⁶⁹⁻⁷¹ Cerca de 40% da HSA extravascular encontra-se na pele, sendo por isso frequentemente usada como proteína modelo na investigação de mecanismos de resposta imunitária, causados por compostos alergénicos.⁷² A HSA desempenha um papel importante no transporte e distribuição sistémica de compostos exógenos e endógenos.^{70, 71, 73}

A HSA contém 35 resíduos de cisteína, 34 dos quais associados em pontes dissulfureto, a única cisteína livre é a Cys34, que representa cerca de 80% dos tióis livres no plasma sanguíneo (Figura I.2).^{63, 70, 73}

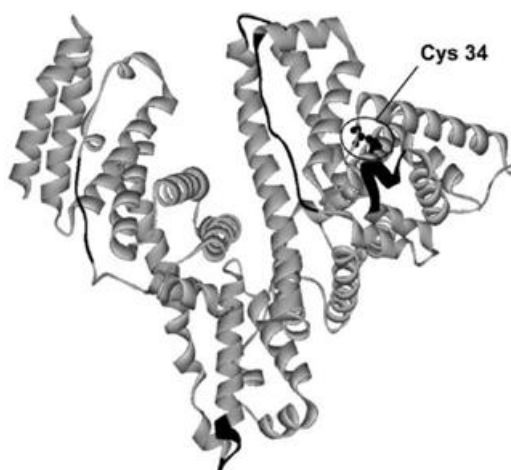
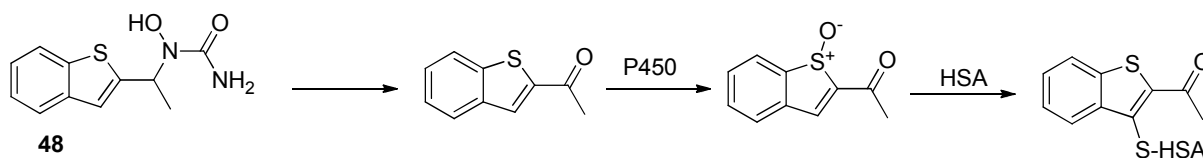


Figura I.2 - Representação da estrutura cristalina da HSA obtida por difracção de raios-X.⁷³

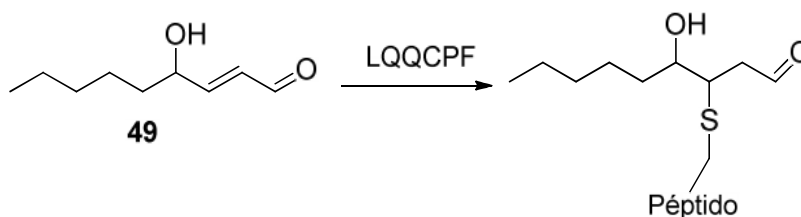
A Cys34 está relacionada com a importante capacidade antioxidante desta proteína, uma vez que reage com os radicais livres. Dentro da estrutura terciária da HSA, a Cys34 encontra-se muito próxima de três resíduos com características básicas, o Asp38, a His39 e a Tyr84, que lhe aumentam a acidez. Como consequência, o grupo tiol da cisteína tem um pK_a mais baixo ($<6,7$) do que o normalmente apresentado na maioria das proteínas e péptidos ($8,0-8,5$), estando principalmente sob a forma de tiolato, altamente nucleófilo.⁶³

Li *et al.*, realizaram estudos *in vivo* com metabolitos electrófilos do fármaco Zileuton (**48**), usado para o tratamento de asma, e demonstraram a formação de ligações covalentes com a Cys34, (Esquema I.16).⁷⁰



Esquema I.16- Formação de aductos entre o resíduo de Cys34 da HSA e um metabolito electrófilo do Zileuton (**48**), (adaptado).⁷⁰

Aldini e colaboradores reagiram diferentes aldeídos α,β -insaturados, com a HSA e com o péptido LQQCPF, isolado da HSA após digestão com a tripsina e contendo a Cys34.⁷⁴⁻⁷⁶ Das reacções de modificação do péptido modelo com diversos aldeídos, entre eles o 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (**49**, HNE), reconhecido produto de peroxidação de lípidos, a Cys34 foi o único resíduo modificado identificado por *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS), o que confirma a elevada reactividade deste resíduo (Esquema I.17).⁷⁶



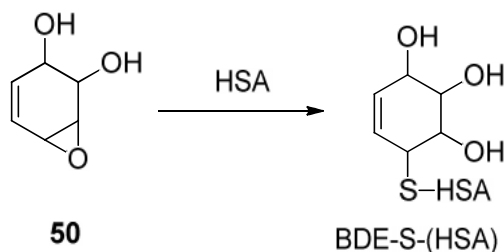
Esquema I.17 - Formação do aducto LQQC(HNE)PF, (adaptado).⁷⁶

Na reacção de modificação da HSA com HNE (**49**) realizada por Aldini *et al.*, foram caracterizados por LC-ESI-MS/MS onze aductos diferentes, oito formados por adição de Michael (MA) e três por formação de base de Schiff (SB); nomeadamente os resíduos His67 (MA), His146 (MA), His242 (MA), His288 (MA), His510 (MA), Lys195 (SB), Lys199 (MA, SB), Lys525 (MA, SB) e Cys34 (MA).⁷⁴ Na HSA o resíduo de Lys199 é considerado, a par da Cys34, como um dos locais mais reactivos para a formação de aductos, *via* base de Schiff ou adição de Michael, respectivamente.^{74, 75} Já na modificação *in vivo* da HSA por HNE, analisada pelos mesmos autores, foram identificados por LC-ESI-MS/MS os a.a. modificados, a Cys34, Lys195, Lys199, Lys510, His67, His146, His242, His288 e His510.⁷⁵

Szapacs *et al.*, também utilizaram espécies de carbonilo reactivas, como **49** para a modificação da HSA, e o LC-ESI-MS/MS para a identificação das sequências peptídicas e respectivos a.a. modificados, tendo caracterizado os seguintes péptidos modificados: LVNEVTEFAK*TCVAD (Lys51), SLH*TLFGDK (His67), NECFLQH*K (His105), AEFAEVSK*LVTDLTK (Lys233), VH*TECCHGDLLECADDR (His242), VHTECCH*GDLLECADDR (His247), ADLAK*YICENQDSISSK (Lys262),

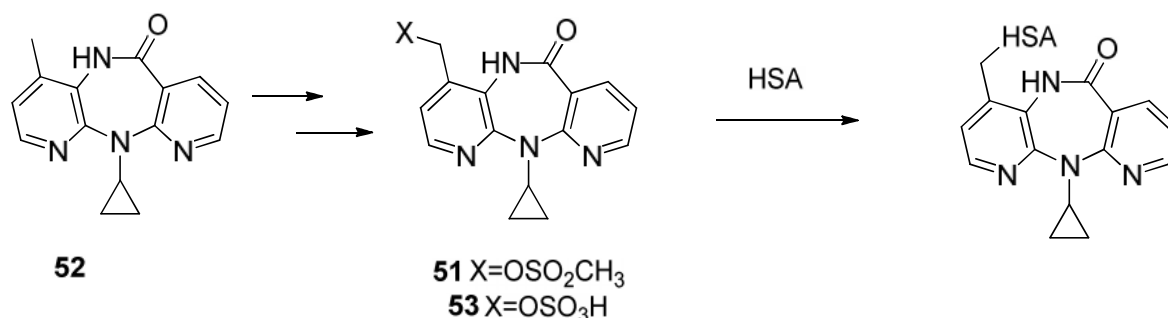
CCAAADPH*ECYAK (His367), VFDEFK*PLVEEPQNLIK (Lys378),
EFNAETFTFH*ADICTLSEK (His510).⁶⁹

Na literatura podemos encontrar reacções de modificação da HSA por ROS, como é o caso de diversas quinonas.^{77,78} Waidyanatha e colaboradores estudaram a modificação da HSA com o diol epóxido do benzeno (**50**, BDE), um metabolito tóxico do benzeno, e identificaram aductos com resíduos de cisteína após hidrólise aos aminoácidos (Esquema I.18).⁷⁷



Esquema I.18 - Reacção de modificação da HSA com o BDE (**50**), (adaptado).⁷⁷

Antunes *et al.*, modificaram a HSA com 12-mesiloxi-NVP (**51**), um mimético do metabolito da nevirapina (**52**, NVP), o 12-sulfoxi-NVP (**53**). A NVP é um fármaco utilizado em terapia combinada anti-HIV (Esquema I.19). Após hidrólise aos a.a. e aos péptidos da proteína modificada, os resíduos modificados foram detectados por LC-ESI-MS/MS e por MALDI-TOF-TOF-MS (*Matrix assisted laser desorption ionization-Time of flight-mass spectrometry*). As duas técnicas de espectrometria de massa mencionadas permitem obter informação complementar sobre os resíduos modificados. O LC-ESI-MS/MS permitiu a identificação dos aminoácidos modificados, de Cys, His e Trp, enquanto o MALDI-TOF-TOF-MS possibilitou especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência dos péptidos **AWAVAR** (213-218; Trp214), **RHPDYSVLLLLR** (337-348; His338), **LDELRDEGKASSAK** (182-195; Lys190) e **ERQIKKQTALVELVK** (520-540; Lys524 ou Lys525).⁷²



Esquema I.19 - Reacção de modificação da HSA com 12-mesiloxi-NVP (**51**), (adaptado).⁷²

I.5.2 Hb e hhMb como biomoléculas de monitorização de espécies electrófilas reactivas

A hemoglobina é a proteína responsável pelo armazenamento e transporte de oxigénio dos pulmões para os outros órgãos e remoção do dióxido de carbono dos órgãos de volta para aos pulmões. O hemo, local de ligação do oxigénio e responsável pelo seu transporte, contém a maioria dos átomos de ferro existentes no corpo humano (ca. 4 g),⁷⁹ e desempenha um papel fundamental no mecanismo de acção de várias drogas anti-malárias.⁸⁰

Nos indivíduos adultos a Hb mais comum encontra-se na forma de tetrâmero denominado HbA ou HbA₀, contendo duas subunidades α e duas β ; a cadeia α contém um resíduo de cisteína com o grupo tiol livre, enquanto a cadeia β contém dois resíduos de cisteína livre.⁷⁹

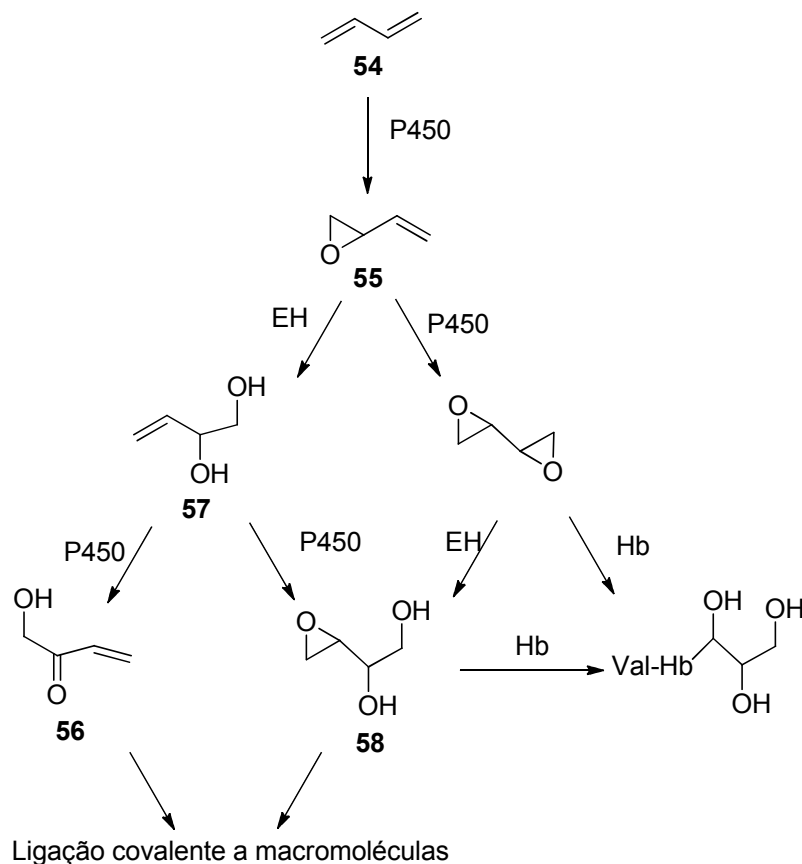
⁸¹ A Hb é uma proteína com 68 kDa, onde a subunidade de cadeias α tem massa molecular de 15,127 kDa e a subunidade de cadeias β tem 15,868 kDa.⁶⁰

A modificação da Hb por vários electrófilos resulta na formação de aductos com diversos resíduos nucleófilos, tais como a cisteína, a lisina e a histidina. Para além disso, existe ainda a possibilidade de formação de aductos com os átomos de azoto- α dos resíduos *N*-terminais das valinas, que são também bons nucleófilos.^{72, 81-84}

Diedrich *et al.*, investigaram a modificação da Hb e de alguns péptidos modelo por diversas quinonas, entre elas a dopamina-quinona, e verificaram que os locais de modificação foram selectivos para os resíduos de cisteína com tióis livres. No caso da modificação da Hb pela dopamina-quinona, verificaram que os dois resíduos de cisteína da cadeia β foram modificados.⁸¹

No âmbito do trabalho anteriormente referido com compostos que mimetizam os metabólitos da NVP, Antunes e colaboradores identificaram como alvos da 12-mesiloxi-NVP (**51**) na Hb os resíduos His20 (VGA**H**AGEYGAEALER, 17-31; Hb- α), Trp37 (LLVVYP**W**TQR, 31-40; Hb- β) e Ser89 (GTFATL**S**ELHCDKLHVDPENFR, 83-104; Hb- β), além da valina *N*-terminal.⁷²

O 1,3-butadieno (**54**, BD) é um composto utilizado na indústria da borracha, poluente do ar e conhecido como potencial cancerígeno. Um método bastante utilizado para avaliar a exposição ao BD (**54**) envolve a detecção dos aductos da hemoglobina formados através da reacção com metabólitos reactivos como o butadieno monoepóxido (**55**, BMO) ou o hidroximetilvinil cetona (**56**, HMKV), (Esquema I.20).^{82, 84}

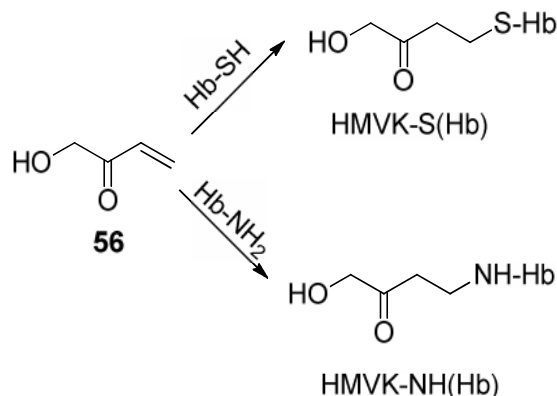


Esquema I.20- Metabolismo do BD (**54**). Abreviaturas: EH epóxido hidrolase; Val-Hb, hemoglobina modificada na valina terminal.⁸⁴

Moll *et al.*, modificaram a Hb com BMO (**55**) e identificaram por LC-MS a formação de aductos peptídicos na cadeia α e β da Hb, embora não tenham identificado explicitamente o aminoácido modificado. Por exemplo, no péptido $\alpha(61-99)$ modificado com três moléculas de **55**, os autores atribuíram a modificação aos resíduos de His72, His87e His89. Foi ainda referido que a modificação de resíduos de histidina na Hb é especialmente interessante devido à importância que estes resíduos assumem em várias propriedades funcionais da Hb. O resíduo His87 (Hb- α), próximo do grupo hemo, desempenha um papel ao nível da afinidade do oxigénio ao grupo hemo e o resíduo His92 (Hb- β) diminui drasticamente a extensão de ligação deste grupo ao dióxido de carbono. A modificação de histidinas da Hb por epóxidos apresenta-se bem documentada.⁸²

Foi investigada a modificação da Hb pelo HMVK (**56**), um aceitador de Michael bastante reactivo gerado *in vivo* pela oxidação do 3-buten-1,2-diol (**57**, BDD) catalisada pelo citocromo P450 (Esquema I.21). Técnicas de espectrometria de massa, permitiram a identificação do aducto da HMVK com a Cys125 (Hb- β), como o local onde ocorreu o maior grau de modificação. No entanto, foram também identificados outros resíduos modificados de Cys,

His, Lys e Arg (Esquema I.21). Os autores estudaram ainda a modificação da Hb com 1,2-di-hidroxi-3,4-epoxibutano (**58**, EBD), outro metabolito do BD formado *in vivo*, e detectaram alguns péptidos modificados.⁸⁴



Esquema I.21 - Formação de aductos da Hb com HMVK (**56**), (adaptado).⁸⁴

Na modificação da Hb pelo anidrido hexa-hidroftálico (**59**, HHPA) (Figura I.3), realizado por Kristiansson e colaboradores, foram identificados seis resíduos de lisina modificados na cadeia β (Lys8, Lys17, Lys59, Lys66 e Lys144) e quatro na cadeia α (Lys7, Lys11, Lys16 e Lys40). Esta investigação foi desenvolvida para compreender a origem dos efeitos alérgicos provocados pela exposição de trabalhadores a anidridos.⁸³

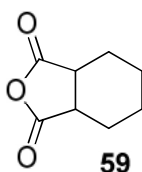


Figura I.3 – HHPA (**59**).

Em 1962 John Kendrew partilhou o Prémio Nobel da Química pela determinação da estrutura cristalina da hhMb obtida por difracção de raios-X. Desde então a mioglobina tem sido muito investigada com o objectivo de perceber quais as funções que realiza no corpo.⁷⁹

A hhMb é uma proteína globular de tamanho pequeno, com 153 a.a. e 16,9 kDa, contendo um grupo hemo. Está muito bem caracterizada, sendo muitas vezes usada como proteína modelo (Figura I.4).^{31, 85}

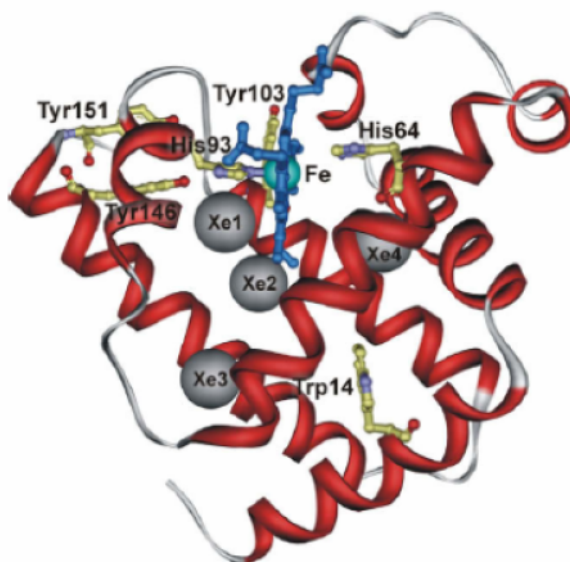


Figura I.4 - Estrutura da hhMb obtida por difracção de raios-X. Podemos observar os resíduos chave (marcados com nome e número), o grupo hemo (a azul) e quatro átomos de xénon, que representam as cavidades internas da proteína.⁸⁵

Vários estudos têm demonstrado o papel desempenhado pela hhMb no armazenamento de oxigénio nos tecidos musculares, tendo sido caracterizada como hemoglobina muscular. Esta proteína encontra-se no citoplasma das células dos músculos esqueléticos e cardíacos, onde armazena o oxigénio,^{79, 85} e desempenha ainda funções ao nível fisiológico do coração.^{86, 87}

A modificação da hhMb por electrófilos reactivos ocorre maioritariamente ao nível dos vários resíduos de histidina e lisina.^{88, 89} Liu *et al.*, investigaram a modificação da hhMb com dois aldeído reactivos, o HNE (**49**) e o 4-oxo-2-nonenal (ONE). Com o composto **49** detectaram aductos, como os resíduos de histidina (His24, His36, His64, e His113) e de lisina (Lys16, Lys42, Lys45, Lys145, e Lys147). No caso da molécula ONE, identificaram o aducto ONE-HIS, no resíduo de His24 e dois aductos de ONE-Lys nos resíduos de Lys16 e Lys145.⁸⁸

Alderton e colaboradores também realizaram reacções de modificação da hhMb com HNE e identificaram por LC-MS/MS seis resíduos de histidina modificados (24, 64, 93, 116, 119 e 152). A modificação da His64 e His93, que se encontram próximas do grupo hemo, pode alterar a estrutura da proteína à volta do hemo e consequentemente ter um impacto na estabilidade redox da proteína.⁹⁰ Na modificação da apomioglobina com HNE realizada por Bolgar e colaboradores foram identificados por ESI-MS, após digestão com a tripsina, os péptidos modificados no resíduo de histidina HKIPIK e VEADIAGHGQEVLR.⁸⁹

A citotoxicidade de catecóis tem sido atribuída a ligações covalentes de quinonas a proteínas. Nesse sentido, Nicolis *et al.* modificaram duas proteínas globulares, a hhMb e a *human myoglobin* (HMb), pela dopamina-quinona. Os autores compararam a ocorrência de modificação no resíduo de cisteína e nos resíduos de histidinas e lisinas nas duas proteínas, uma vez que a hhMb não contém resíduos de cisteína e a HMb contém um único resíduo, a Cys110. Verificaram que espécies altamente reactivas como as quinonas só reagem com determinados a.a. da proteína, sendo a Cys110 da HMb o resíduo mais reactivo. Foram ainda caracterizados por LC-ESI-MS/MS outros resíduos da hhMb modificados, a His81 e/ou a His82.³¹

Recentemente, Szuchman-Sapir e colaboradores investigaram a modificação da HMb pelo ácido hipocloroso (HCOCl). Os autores identificaram o péptido YLEFISECIIQVLQSK (103-118), modificado no resíduo de Cys110, e verificaram uma considerável selectividade para este a.a..⁹¹

I.5.3 Métodos de identificação de aductos de proteínas/péptidos

Em 2002 o Prémio Nobel da Química foi partilhado por investigadores, que trabalharam em duas importantes técnicas de análise química aplicadas a biomacromoléculas: a espectrometria de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (RMN). Os laureados foram John B. Fenn, Koichi Tanaka (MS) e Kurt Wüthrich (RMN).⁹²

A espectroscopia de RMN é uma importante ferramenta no estudo da estrutura tridimensional de uma proteína, da dinâmica e das interações de biomacromoléculas em solução aquosa.⁹² Em comparação com a MS, a maior limitação da espectroscopia de RMN para o estudo de macromoléculas biológicas é a menor sensibilidade. No entanto, muitos esforços têm sido investidos para melhorar esta limitação, como por exemplo o uso de campos magnéticos mais elevados. A investigação de RMN de proteínas implica a aquisição de um grande número de espectros, o que impõe uma elevada estabilidade das amostras e pode, por isso, constituir uma limitação. Todavia, a aquisição de espectros de RMN por técnicas multidimensionais num curto intervalo de tempo pode permitir a investigação em tempo real de processos bioquímicos, como por exemplo o enrolamento de proteínas. Os espectros de RMN de correlação heteronuclear permitem a caracterização de biomacromoléculas, que não seria possível recorrendo apenas aos espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN unidimensionais devido à sobreposição de sinais. No final dos anos oitenta a introdução do enriquecimento isotópico de proteínas na espectroscopia de RMN, com ¹³C e ¹⁵N, facilitou o estudo de proteínas de maiores dimensões, uma vez que aumentou selectivamente os sinais dos resíduos

marcados, facilitando a identificação destes e o estabelecimento de correlações.⁹²⁻⁹³ Os espectros de correlação ^1H - ^{15}N de proteínas são conhecidos como “a impressão digital da proteína”, pela sua eficácia na identificação destas espécies.⁹²⁻⁹⁵ A espectroscopia de RMN tem vindo continuamente a evoluir, de modo a adaptar-se aos novos desafios das ciências da vida, tendo como foco a caracterização de biomoléculas, as interações moleculares, as transições de enrolamento-desenrolamento de proteínas e as ligações de pequenas moléculas, como por exemplo fármacos a proteínas.^{93, 96, 97}

A difracção de raios-X é outra técnica utilizada para determinar a estrutura tridimensional de biomacromoléculas. Contudo, o processo de cristalização de proteínas nem sempre é fácil, e obter cristais que difractam é um desafio.^{98, 99} A cristalização de proteínas é normalmente realizada sob condições não fisiológicas, de pH e temperatura, e na presença de aditivos, como por exemplo soluções tampão, o que pode alterar a conformação da amostra face à apresentada nas suas condições biológicas.^{99, 100} Outra questão a considerar ao nível das limitações da difracção de raios-X é o facto das estruturas cristalinas, que representam a estrutura termodinamicamente mais estável das proteínas no estado sólido, poderem não representar a conformação que a proteína possui nas células.¹⁰⁰

John B. Fenn e Koichi Tanaka partilharam o Prémio Nobel da Química, devido à aplicação da MS a biomacromoléculas. Para o efeito utilizaram duas metodologias de ionização inovadoras, desenvolvidas nos anos oitenta: a desorção e ionização a Laser usada por Tanaka, e a ionização por *electrospray* utilizada por Fenn. O ESI e o MALDI tornaram-se numa ferramenta indispensável à análise de biomacromoléculas, em particular as proteínas.⁹² A aplicação destas técnicas permite a identificação de proteínas, assim como a determinação da massa molar e ainda a identificação de qualquer modificação covalente que altere a sua massa. Estas técnicas tornaram-se comercialmente disponíveis no início dos anos noventa e revolucionaram o uso da MS;^{96, 101} que desde então assumiu um papel relevante na investigação em ciências biomédicas.⁵⁹

O sucesso da espectrometria de massa no estudo de biomacromoléculas resulta da conjugação de vários factores, tais como o tipo de ionização, os analisadores utilizados, como por exemplo o analisador por tempo de voo (*Time-Of-Flight*, TOF) e o analisador de armadilha de iões (*ion-trap*), bem como a eficácia das várias estratégias de separação e digestão de biomacromoléculas.¹⁰¹

O MALDI foi desenvolvido quase simultaneamente por dois grupos de investigação: Karas e Hillenkamp na Alemanha e Tanaka e colaboradores no Japão.⁵⁹ Numa análise por MALDI-TOF-MS a amostra é inicialmente misturada com a matriz e colocada numa placa de MALDI onde co-cristaliza, sendo posteriormente irradiada por centenas de *shots* de Laser.

Desta irradiação resulta a amostra e a matriz vaporizadas e simultaneamente ionizadas (Figura I.5).

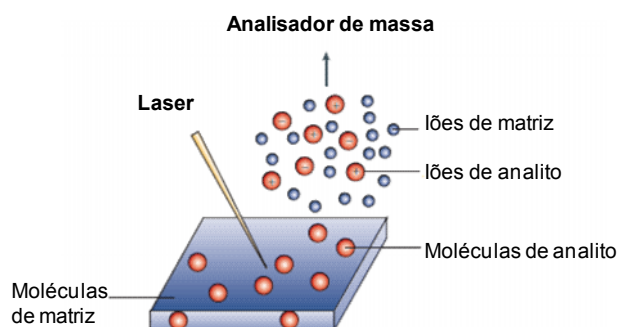


Figura I.5 - Irradiação por um feixe de laser de uma amostra co-cristalizada com a matriz, e consequente sublimação e ionização das mesmas, (adaptada).¹⁰²

Os íons gerados são acelerados para o analisador por tempo de voo. Os íons pequenos atravessam rapidamente o analisador e são registados em primeiro lugar no detector, que só depois detecta os íons de maiores dimensões, conhecido como modo linear (Figura I.6a).^{59, 101, 103} A resolução dos instrumentos a funcionar em modo linear é relativamente pobre, uma vez que valores de m/z muito próximos não são distinguidos. Este problema foi resolvido pela introdução de um reflector no equipamento, que permitiu que os íons com a mesma razão m/z atingissem o detector ao mesmo tempo, Figura I.6b.^{103 104}

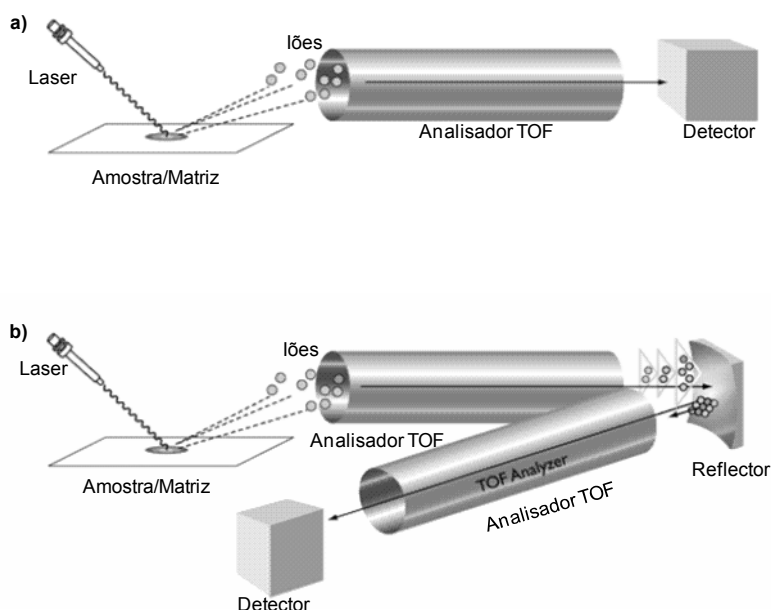


Figura I.6 - Representação esquemática de um MALDI-TOF-MS a funcionar em modo linear (a), ou em modo reflector (b).¹⁰³

Uma limitação da técnica é a análise de massas abaixo dos 500 Da, uma vez que os iões da amostra podem ser mascarados pelos iões da matriz.¹⁰¹

As vantagens do MALDI-TOF-MS na análise de biomacromoléculas prendem-se com a facilidade de manuseamento do equipamento, que permite a rápida realização de análises, a utilização de analisadores TOF, que possibilitam a obtenção de análises com elevada precisão e resolução, e a elevada sensibilidade das análises realizadas, que permite a análise de péptidos em quantidades femtomolares.¹⁰³ Contudo, o grande potencial do MALDI deriva da sua eficiência na análise de misturas complexas, sendo uma técnica bastante promissora, em diagnóstico de fluidos biológicos como a urina e o soro.¹⁰⁵

O ESI assume um papel de relevo na caracterização de biomacromoléculas, sendo aplicado a uma ampla gama de amostras na fase líquida. De uma forma simples, a técnica consiste na produção de um *spray* fino de gotas fortemente carregadas quando no capilar a amostra é sujeita a um campo eléctrico intenso. O solvente contido nas gotas é evaporado por exposição a uma contra corrente de azoto aquecido libertando-se os iões que passam para o analisador de massa onde são separados de acordo com o valor m/z . O *electrospray* pode ser utilizado em modo de infusão directa ou acoplado a um cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), (Figura I.7) é uma técnica de rotina utilizada em muitos laboratórios para a análise de proteínas e péptidos, uma vez que permite a separação eficiente de compostos biológicos por eluição na coluna cromatográfica seguida da identificação de cada molécula.^{101, 106}

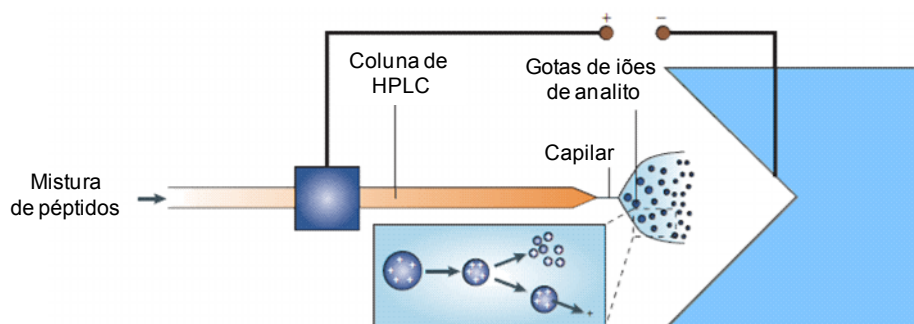


Figura I.7 - Representação esquemática de um LC-MS, (adaptado).¹⁰²

O MALDI-TOF-MS e o LC-ESI-MS/MS são técnicas utilizadas com bastante frequência na análise de aductos de proteínas.^{57, 69} A utilização da MS para a identificação dos resíduos de proteínas e/ou péptidos modificados por electrófilos reactivos envolve a determinação do número de moléculas de electrófilo ligadas covalentemente à proteína e/ou péptido, a identi-

ficação dos resíduos modificados, e a determinação da sua posição na sequência da proteína e/ou péptido.⁶⁰

O MALDI pode ser utilizado para determinar a massa intacta de uma proteína e o número de moléculas de electrófilo ligadas covalentemente à proteína, por subtração das massas da proteína modificada e nativa obtidas nos espectros de MALDI-TOF-MS (Esquema I.22).^{56, 72}

A tripsina é a enzima normalmente utilizada para converter proteínas a péptidos. Esta protease realiza o corte exclusivo no carbonilo terminal dos resíduos de arginina e lisina. Os péptidos obtidos, com massas entre 600–2500 Da, são adequados para identificação por MALDI-TOF-MS, *peptide mass fingerprinting*.^{57, 102, 107} São utilizados na identificação dos péptidos programas de pesquisa de base de dados como o *ExPASy*,¹⁰⁸ que possuem valores teóricos de massa de péptidos originados por digestões *in silico* de proteínas conhecidas.⁵⁹

A digestão enzimática com a tripsina, de proteínas modificadas por espécies electrófilas reactivas permite a identificação dos péptidos que sofreram modificação por MALDI-TOF-MS. Para além disso, é possível realizar a fragmentação dos péptidos com massa consistente com a modificação pelo electrófilo usando MALDI-TOF-TOF-MS, de modo a especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência do péptido (Figura I.8 e Esquema I.14).^{56, 72, 102}

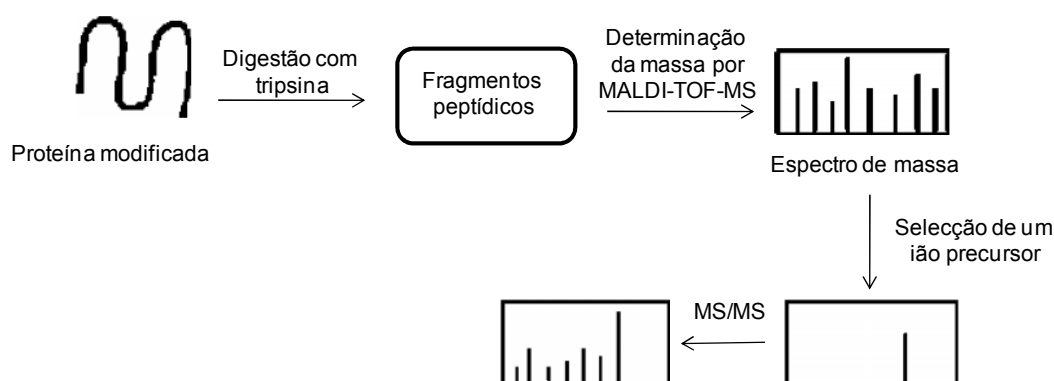


Figura I.8 - Representação esquemática, de uma aproximação para identificação dos resíduos modificados de uma proteína por MALDI-TOF-TOF-MS.⁵⁹

Antunes e colaboradores realizam a aproximação descrita acima para a identificação dos péptidos e dos resíduos modificados nas reacções de modificação da HSA e Hb com a 12-mesiloxi-NVP (**51**). Nesse sentido, após hidrólise com a tripsina das proteínas nativas e modificadas, os autores realizaram os respectivos espectros de MALDI-TOF-MS.

A presença de novos picos nos espectros das proteínas modificadas com valores de m/z compatíveis com a modificação de **51** foi atribuída a possíveis aductos peptídicos, como por exemplo, o péptido AWAVAR (213-218) da HSA a m/z de 937,55 (Figura I.9a). De modo a especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência do péptido modificado, realizaram a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS dos potenciais aductos peptídicos, permitindo uma identificação inequívoca do péptido modificado. A Figura I.9b apresenta o espectro de MS/MS do péptido modificado da HSA, AWAVAR (213-218).⁷²

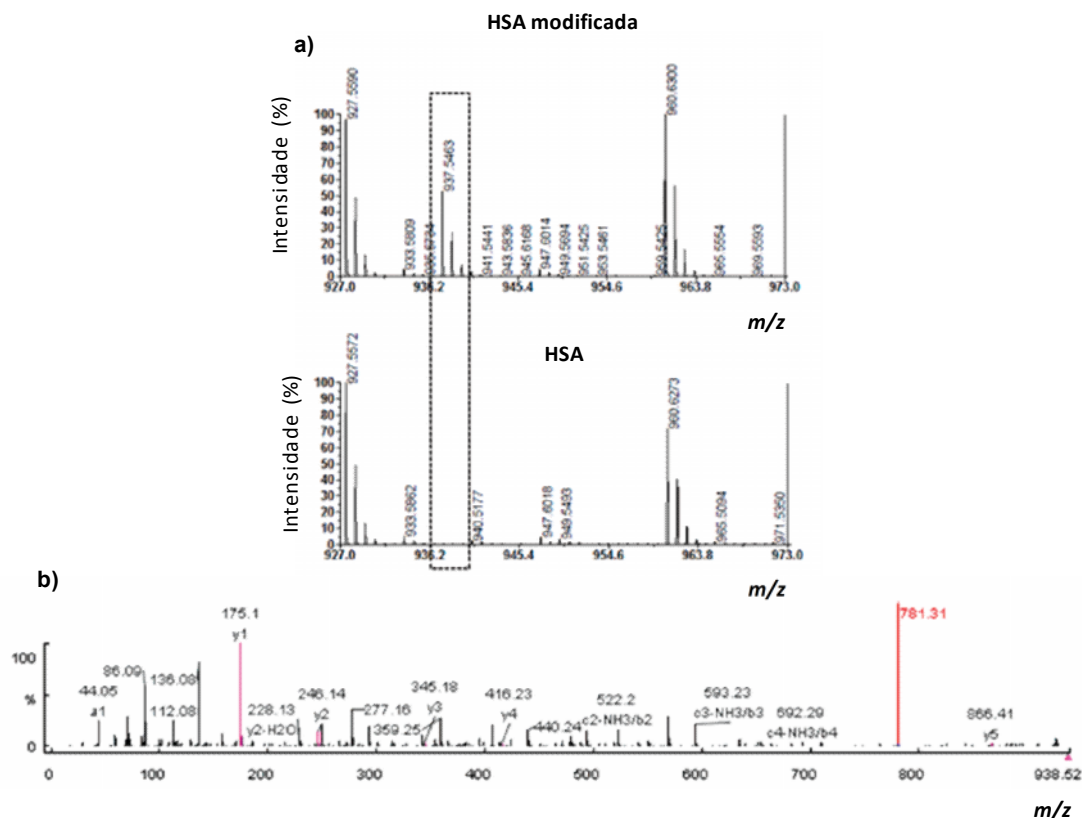
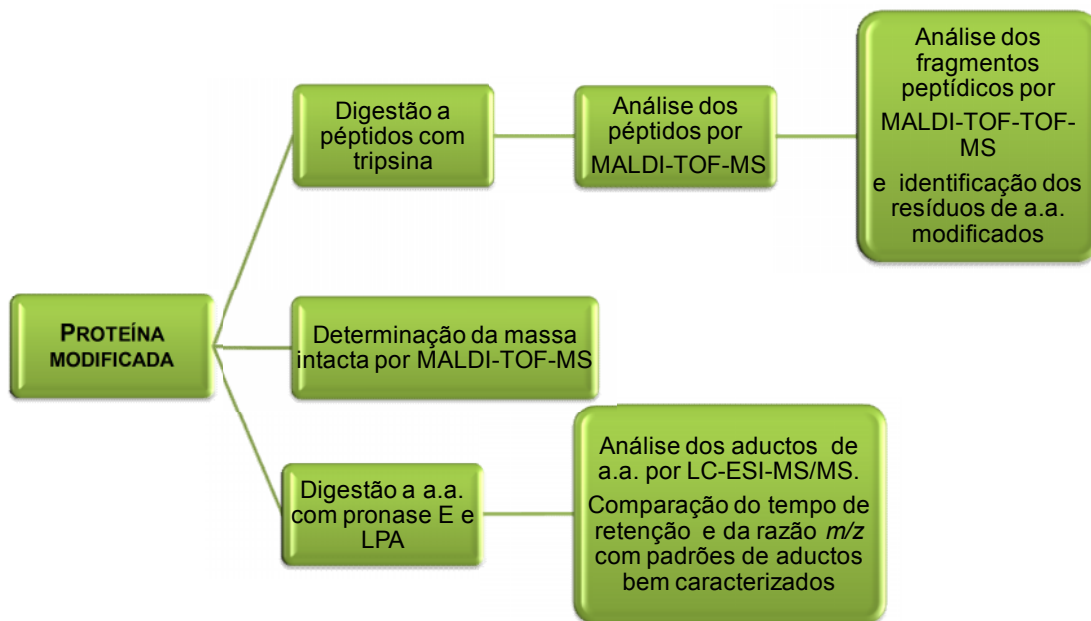


Figura I.9. - a) Espectro de MALDI-TOF-MS da HSA nativa e modificada com 12-mesiloxi-NVP (**51**).

b) Espectro de MS/MS do pico a m/z 937,55 da HSA modificada com **51**.⁷²

Uma outra abordagem consiste na hidrólise das proteínas modificadas aos a.a. usando, por exemplo, duas enzimas: a pronase E (EC 3.4.24.31) e a LAP (EC 3.4.11.1). A pronase E é constituída por um conjunto de enzimas com múltiplas especificidades, sendo utilizada para realizar a hidrólise completa de proteínas. A LAP hidrolisa sequencialmente o terminal amino dos resíduos de a.a. numa cadeia polipeptídica, e deste modo assegura a completa acção hidrolítica da pronase E, garantindo a hidrólise total da proteína.¹⁰⁹ Os aductos libertados são analisados por LC-ESI-MS/MS. No caso de se dispor de padrões sintéticos bem caracterizados, é possível, por comparação do tempo de retenção e da razão m/z , identificar

os resíduos de a.a. modificados e a regioselectividade da modificação em cada resíduo (Esquema I.22).^{56, 57, 72}



Esquema I.22 - Aproximação possível para a identificação de resíduos de proteínas modificados.

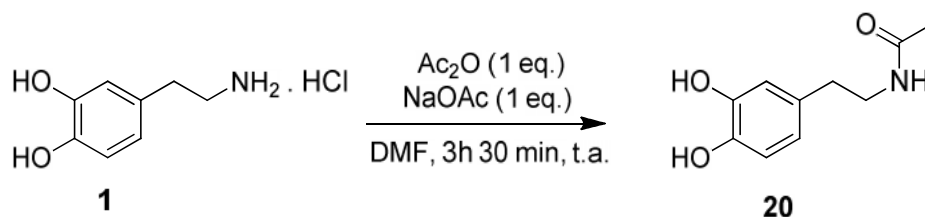
Com este trabalho pretendeu-se modificar as proteínas HSA, Hb e hhMb e o péptido modelo da HSA, LQQCPF, por reacções *in vitro* com as quinonas derivadas da DA, NADA, MeDA e diMeDA. As proteínas modificadas com CA foram sujeitas a hidrólise enzimática a péptidos e a a.a., e os resíduos modificados foram caracterizados por MALDI-TOF-MS e por LC-ESI-MS/MS. Este procedimento permitiu identificar os pontos de susceptibilidade reactiva nas proteínas modificadas, que podem eventualmente determinar as características toxicológicas das diferentes quinonas, levar a mecanismos de toxicidade e induzir efeitos adversos. Este conhecimento poderá vir a ser aplicado em estudos de biotransformações das CA-quinonas, *in vivo*, pelas proteínas investigadas, de modo a prever os possíveis resíduos passíveis de modificação, e possíveis indutores de toxicidade.

Capítulo II– Discussão de Resultados

II.1 Síntese e caracterização de derivados *N*-substituídos da DA

De modo a investigar reacções com a.a., proteínas e DNA, foram utilizados como compostos modelo da DA, os derivados *N*-substituídos, NADA (**20**) e *N*-benziloxicarbonil-3,4-dihidroxifeniletilamina (**60**, DA-Cbz).

A NADA foi preparada através da reacção de acetilação da DA. Para tal, foi utilizado anidrido acético (Ac_2O) e acetato de sódio (NaOAc), em *N,N*-dimetilformamida (DMF) durante 3 h e 30 min à t.a. (Esquema II.1). O método é simples, e o produto foi obtido com 77 % de rendimento, através de um mecanismo típico de uma acetilação.¹¹⁰



Esquema II.1 – Reacção efectuada para preparação da NADA (**20**).

Na literatura encontram-se alguns métodos de preparação da NADA, cujos rendimentos variam entre os 31-90 %.^{37, 111-113} Relativamente à caracterização da NADA, Mueller *et al.*, realizaram a atribuição por ^1H e ^{13}C -RMN,¹¹⁴ e Cambie *et al.*, apresentaram apenas a identificação por IV.¹¹³

Na Figura II.1, podemos observar os espectros de ^1H e ^{13}C -RMN da NADA, com as respectivas atribuições, realizadas por comparação com a literatura,¹¹⁴ e com os respectivos espectros da DA. No espectro de ^1H -RMN os prótons dos grupos metileno H7 e H8 surgem como tripletos a 2,55 e 3,23 ppm, respectivamente. Os prótons H8 surgem num campo mais baixo devido à desblindagem por parte do grupo amida adjacente. Relativamente aos prótons aromáticos H6 e H5 surgem como dupletos com constantes de acoplamento típicas de prótons *orto* a 6,57 ppm ($J=7,8$ Hz) e 6,73 ppm ($J=8,0$ Hz), respectivamente. O H2 aparece como singlete a 6,66 ppm. Os dados espectroscópicos encontram-se na Tabela II.1, e os valores nos espectros de ^1H , ^{13}C -RMN e IV estão concordantes com os da literatura.^{113, 114}

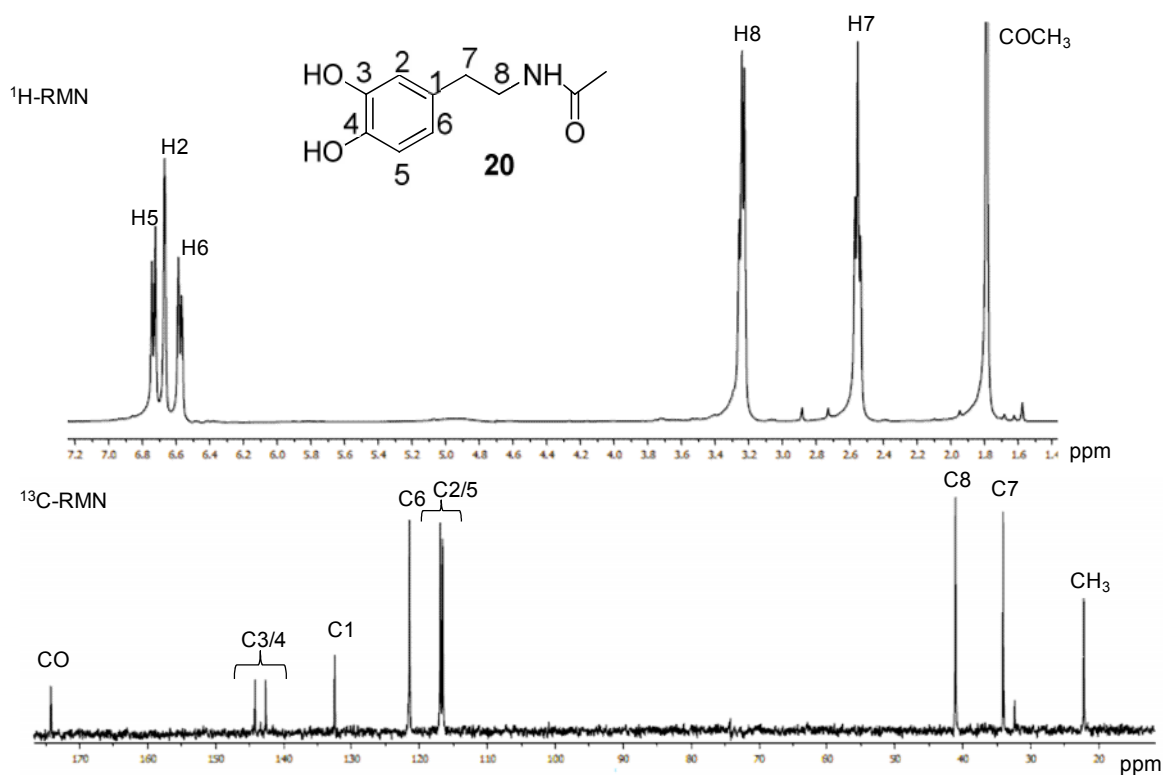
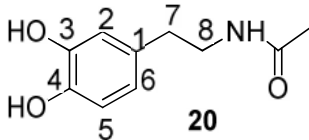


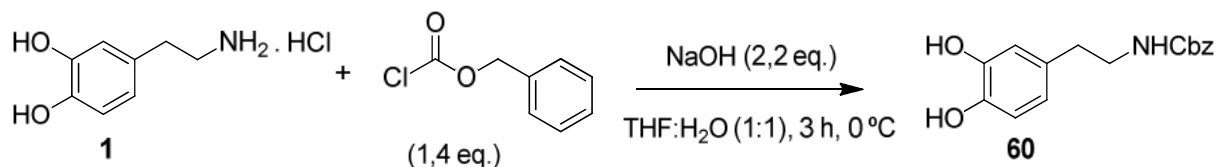
Figura II.1 - Espectros de ^1H e ^{13}C -RMN da NADA (**20**).

Tabela II.1 - Dados espectroscópicos da NADA (**20**).

Estrutura			
			
IV (KBr)	^1H -RMN (D_2O)	^{13}C -RMN (D_2O)	MS (ESI)
ν_{max} (cm^{-1})	δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
		22,1 (CH_3)	
		34,1 (C7)	
3391 (MF^+ , OH)	1,79 (3H, s, COCH_3)	41,1 (C8)	
1646 (m^+ , $\text{C}=\text{O}$)	2,55 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H7)	116,6 (C2/5)	218 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$
1557, 1435,	3,23 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H8)	116,9 (C2/5)	196 [MH] $^+$
1373 ($\text{C}=\text{C}$)	6,57 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H6)	121,5 (C6)	154 [DAH] $^+$
1291 ($\text{C}-\text{O}$)	6,66 (1H, s, H2)	132,5 (C1)	
	6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H5)	142,7 (C3/4)	
		144,2 (C3/4)	
		174,3 (CO)	

* Para o significado das abreviaturas cf. seção III.1.2, pág. 150.

A DA-Cbz (**60**), foi sintetizada a partir da DA (Esquema II.2), com modificações ao procedimento experimental de Fernández *et al.*¹¹⁵ O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco, com 89 % de rendimento, superior ao obtido por Fernández *et al.* (70 %).



Esquema II.2 - Preparação da DA-Cbz (**60**).

A análise dos resultados obtidos nos espectros de ^1H e ^{13}C -RMN foi realizada por comparação com a literatura,¹¹⁵ e sustentada pela experiência bidimensional de HMBC, Figura II.2. Os prótons aromáticos H5 e H6 foram distinguidos inequivocamente pela análise do espectro de HMBC. A correlação com H7 e H8 permitiu a identificação do C1 a 130,5 ppm, que também tem correlação com H5, que surge com um desvio de 6,78 ppm. Assim sendo, a 6,59 ppm foi atribuído H6 que correlaciona com C2, que surge a 115,6 ppm, e com C4 (a 143,0 ppm). Os dados espectroscópicos do composto DA-Cbz estão apresentados na Tabela II.2.

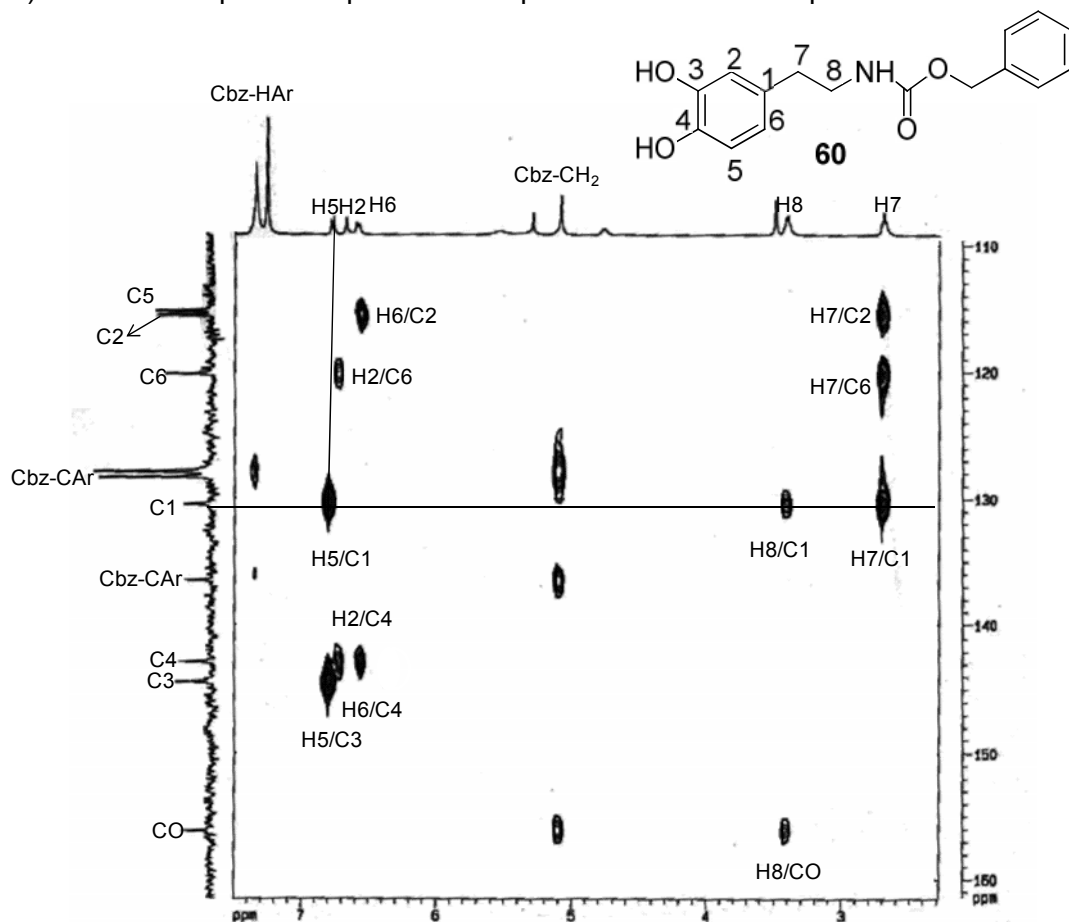
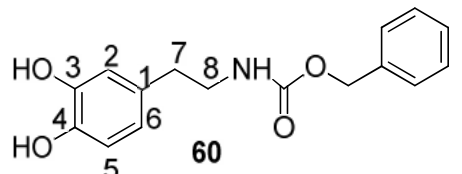


Figura II.2 - Espectro de HMBC do composto DA-Cbz (**60**).

Tabela II.2 - Dados espectroscópicos da DA-Cbz (**60**).

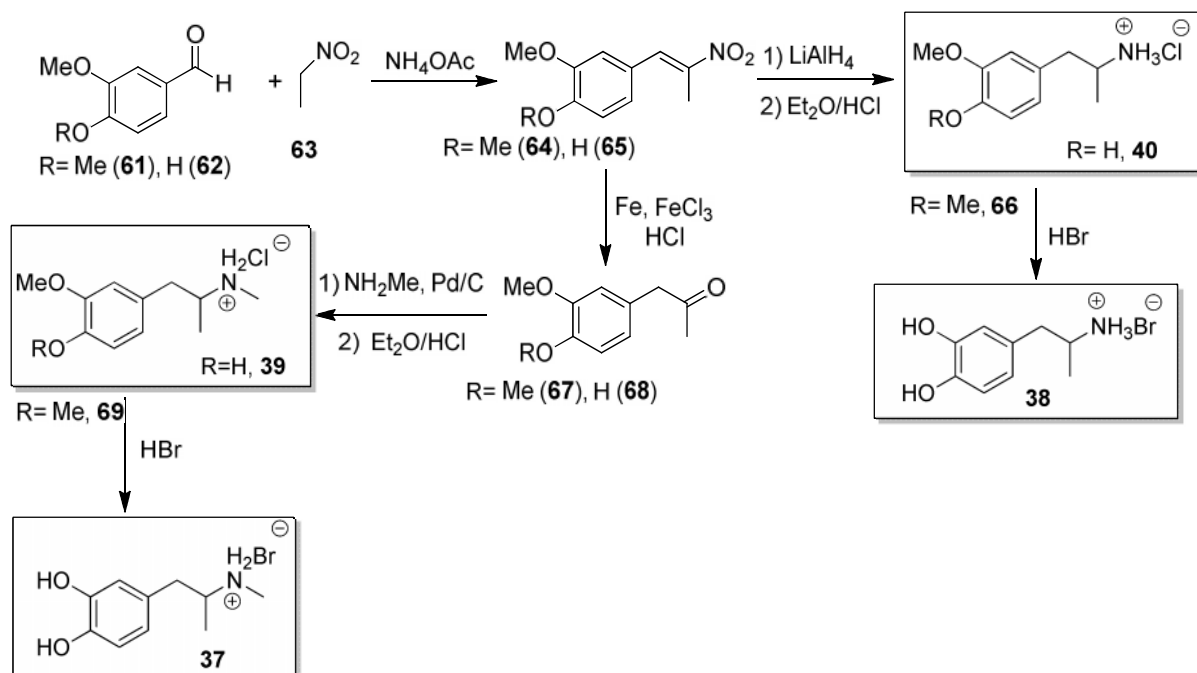
Estrutura			
			
IV (KBr)	¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (EI)
ν_{\max} (cm ⁻¹)	δ (ppm)	δ (ppm)	<i>m/z</i>
		35,2 (C7)	
		42,2 (C8)	
		66,3 (Cbz-CH ₂)	287
	2,69 (2H, t, <i>J</i> = 6,4 Hz, H7)	115,3 (C5)	
3479 (F*, OH)	3,40-3,42 (2H, m, H8)	115,6 (C2)	
3338 (F, OH)	5,09 (2H, s, Cbz-CH ₂)	120,2 (C6)	HRMS-EI
3025 (f*, N-H)	6,59 (1H, d, <i>J</i> = 7,2 Hz, H6)	127,9 (Cbz-CAr)	(calc.) obtido
1686 (F, C=O)	6,68 (1H, s, H2)	128,3 (Cbz-CAr)	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄ [M] ⁺
	6,78 (1H, d, <i>J</i> = 7,6 Hz, H5)	130,5 (C1)	(287,1158)
	7,34 (5H, s, Cbz-HAr)	136,6 (Cbz-CAr)	287,1152
		143,0 (C4)	
		144,5 (C3)	
		156,2 (CO)	

* Para o significado das abreviaturas cf. seção III.1.2, pág. 150.

II.2 Síntese dos metabolitos do *Ecstasy*

A síntese dos metabolitos do *Ecstasy*, diMeDA (**37**), MeDA (**38**), HMMA (**39**) e HMA (**40**), encontra-se bem documentada na literatura.^{44, 116, 117} Foi realizada no nosso laboratório,⁴⁴ tendo com material de partida os respectivos benzaldeídos e nitroetano, segundo os procedimentos de Borgman *et al.* e Pizarro *et al.* (Esquema II.3).^{116, 117} Assim sendo, por condensação do grupo carbonilo dos compostos **61** e **62** com o nitroetano (**63**) formam-se os produtos **64** e **65**. Destes compostos divergem duas vias sintéticas distintas para a síntese dos metabolitos. Para os produtos HMA (**40**) e MEDA (**38**) (com a amina livre) realiza-se a redução de **64** e **65** com hidreto de alumínio e lítio (LiAlH₄) à amina, e subsequente formação dos hidrocloreto correspondentes, **40** e **66**.

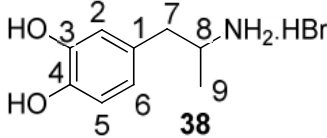
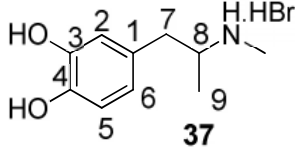
Para obter o metabolito MeDA (**38**), realiza-se ainda com HBr a O-desmetilação do composto **66**. Para a preparação dos produtos, HMMA (**39**) e diMeDA (**37**) (com a amina metilada), os compostos **64** e **65** são convertidos com ferro metálico às cetonas correspondentes **67** e **68**. De seguida realiza-se uma aminação redutiva com metilamina na presença de Pd/C, e utilizando uma solução de éter etílico saturada com HCl (g), são obtidos os respectivos hidrocloretos **69** e **39**. Para a obtenção do metabolito diMeDA (**37**) a remoção dos grupos metoxilos de **69** realiza-se na presença de HBr.



Esquema II.3 - Síntese dos metabolitos do Ecstasy diMeDA (**37**), MeDA (**38**), HMMA (**39**) e HMA (**40**).

Os metabolitos do *Ecstasy*, diMeDA (**37**), MeDA (**38**), HMMA (**39**) e HMA (**40**), foram na grande maioria caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e IV.^{44, 116, 117} Os dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos compostos MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), utilizados como padrões em diversos ensaios subsequentes, estão apresentados na Tabela II.3. Relativamente ao espectro do metabolito **38**, o próton aromático H5 surge a 6,79 ppm, como um duplete fino resultado de um acoplamento *orto*, e H6 aparece a 6,62 ppm, como um duplete largo, devido ao acoplamento *meta* com H2. No espectro do composto **37**, não foi possível a atribuição dos prótons H5 e H6 porque os sinais não se encontram bem resolvidos (Tabela II.3).

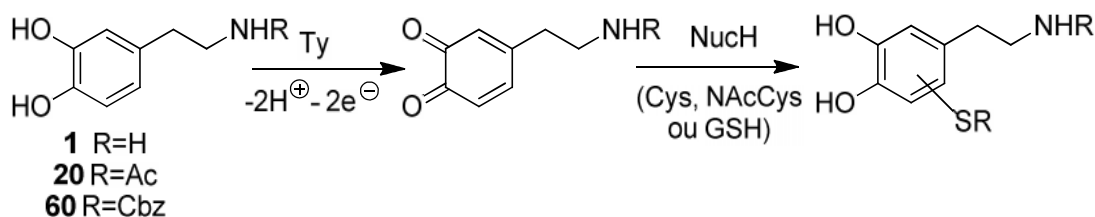
Tabela II.3 - Dados de ^1H -RMN dos compostos MeDA (**38**) e diMeDA (**37**).

Estrutura	^1H-RMN (D_2O)
	δ (ppm)
	1,18 (3H, d, J = 6,4 Hz, H9)
	2,64-2,76 (2H, m, H7)
	3,45 (1H, sx, J = 6,8 Hz, H8)
	6,62 (1H, d, J = 6,4 Hz, H6)
	6,71 (1H, s, H2)
	6,79 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5)
	1,16 (3H, d, J = 6,8 Hz, H9)
	2,58 (3H, s, N-CH ₃)
	2,68 (1H, dd, J = 13,6 e J = 8,0 Hz, H7a)
	2,81 (1H, dd, J = 13,6 e J = 6,0 Hz, H7b)
	3,36 (1H, sx, J = 6,8 Hz, H8)
	6,62 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5/6)
	6,71 (1H, s, H2)
	6,79 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5/6)

II.3 Preparação e caracterização de derivados sulfidrilo de CA

II.3.1 Preparação por oxidação enzimática de derivados sulfidrilo da DA, NADA e DA-Cbz

Tendo como base a investigação desenvolvida no nosso laboratório sobre a oxidação da diMeDA (**37**) e MeDA (**38**) com *mushroom tyrosinase*, e subsequente adição dos nucleófilos de enxofre GSH e NAcCys,⁴⁴ realizou-se uma aproximação idêntica na síntese enzimática de tio-conjugados da DA, NADA e DA-Cbz. A metodologia envolve uma oxidação biomimética, na qual se utiliza *mushroom tyrosinase* e os bionucleófilos de enxofre, NAcCys, Cys, e GSH (Esquema II.4) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM). Trata-se de uma aproximação já investigada para a DA,^{18, 29-31} no entanto, segundo a literatura por nós consultada, é aqui apresentada pela primeira vez para as restantes CA.



Esquema II.4 - Esquema geral de preparação de derivados sulfidrilo da DA, NADA e DA-Cbz.

A purificação dos produtos das reacções foi realizada por cromatografia de fase reversa, RP-18, e utilizou-se o espectrofotómetro de UV para verificar a presença de aducto. Na literatura o UV é frequentemente utilizado para caracterizar os conjugados sulfidrilo da DA e da NADA. O λ_{max} de ~ 257 e 293 nm evidencia uma aromaticidade típica de aducto com um resíduo de Cys, NAcCys ou GSH ligado ao anel aromático.^{11, 24, 25, 27-31, 35} Desta forma, as fracções com o λ_{max} referido, foram evaporadas à secura e purificadas no HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-FCT-1 (Para o significado da abreviatura cf. secção III.1.2, pág. 150).

O composto maioritário das reacções forma-se por adição do nucleófilo de enxofre à posição 5 do anel da CA (Tabela II.4), através de uma reacção de adição de Michael 1,6. Embora em menores quantidades, possivelmente devido a impedimentos estereoquímicos, foi também isolado o aducto em 2 (Tabela II.4). As reacções são regioselectivas e de um modo geral os rendimentos são bastante satisfatórios (36-90%), (Tabela II.4).

Tabela II.4 - Rendimento dos aductos isolados, nas reacções de oxidação enzimática da DA, NADA e DA-Cbz com os bionucleófilos, GSH, NAcCys e Cys.

CA	Nuc	Aductos isolados	η (%)
DA	GSH	2-GSH-DA (70)	11
		5-GSH-DA (11)	78
		2-NAcCys-DA (71)	4
DA	NAcCys	5-NAcCys-DA (72)	83
		2,5-di-NAcCys-DA (73)	residual
		6-NAcCys-DA (74)	residual
DA	Cys	2-Cys-DA (14)	8
		5-Cys-DA (12)	82
NADA	GSH	5-GSH-NADA (75)	83
NADA	NAcCys	5-NAcCys-NADA (21)	79
NADA	Cys	5-Cys-NADA (76)	72
DA-Cbz	GSH	5-GSH-DA-Cbz (77)	63
DA-Cbz	NAcCys	5-NAcCys-DA-Cbz (78)	36
DA-Cbz	Cys	5-Cys-DA-Cbz (79)	50

No Esquema II.4, está apresentado a preparação de derivados sulfidrilo das CA, onde podemos observar que primeiro ocorre a formação da *o*-quinona, gerada pela *mushroom tyrosinase*. A reacção de oxidação ocorre num único passo, através de um processo de transferência simultânea de dois electrões. De seguida, duas reacções competem, uma reacção intramolecular, de cicilização pelo grupo amino no caso da DA e uma reacção intermolecular com o nucleófilo de enxofre.^{31, 118, 119} Tse *et al.* verificaram que a velocidade da reacção intermolecular com a Cys e a GSH é três ordens de magnitude superior à reacção intramolecular na DA, e deste modo, ocorre a formação dos respectivos tio-conjugados, os mono-aductos em 2 e 5 (maioritário).³³ A salientar que a Cys inibe a *tyrosinase* impedindo reacções de oxidação sucessiva.³⁴

Como podemos observar pelos aductos isolados na Tabela II.4, a reacção é regioselectiva, sendo o composto maioritário, aducto em 5, formado a partir de uma adição de Michael 1,6. Huang *et al.*, propõem um mecanismo onde explicam a preferência do ataque nucleófilo ao C5 da DAQ, uma vez que seria de esperar que a adição nucleófila ocorresse no C6, átomo mais electropositivo. Segundo os autores, a regioselectividade da reacção para o C5 resulta de uma catálise básica intramolecular, que ocorre devido ao protão ligado ao átomo de enxofre (cf. Esquema I.5, pág 7).³⁵ Também Jameson e colaboradores, propõem um mecanismo idêntico.¹⁹ O mecanismo proposto pelos autores não explica a preferência do ataque nucleófilo ao C5, uma vez que um efeito semelhante pode ocorrer em C2. Contudo, como os bionucleófilos de enxofre são nucleófilos moles, numa adição de Michael 1,6, seria de esperar o ataque nucleófilo no C5 (carbono δ relativamente ao carbonilo), independentemente de ocorrer catálise intramolecular. Além disso, o C5 é estereoquimicamente mais desimpedido, favorecendo a formação do produto cinético, ou seja, o aducto em 5.

Em relação à caracterização dos produtos das reacções, foram realizados espectros de ¹H-RMN e ¹³C-RMN, e nalguns casos experiências bidimensionais de HMQC e HMBC. Foram ainda caracterizados por ESI-MS. A atribuição dos sinais nos espectros de protão foi confirmada, por comparação com a literatura.^{11, 24, 25, 27, 31, 35} A título de exemplo representativo, os dados espectroscópicos dos produtos 5-GSH-DA (**11**) e 2-NACys-DA (**71**), estão apresentados na Tabela II.5, e serão devidamente discutidos. De referir que, no espectro de protão o perfil na zona aromática é característico dos aductos formados. Para os aductos em 5 os protões aromáticos H6 e H2, surgem com um singlete a ~ 6,68 e 6,77 ppm, respectivamente (Tabela II.5 e Figura II.3). Relativamente aos aductos em 2, os protões aromáticos H5 e H6 sofrem acoplamento *orto*, e aparecem como um duplete a ~ 6,71 e 6,82 ppm, respectivamente, com constantes de acoplamento de ca. 8,2 Hz (Tabela II.5 e Figura II.4). Embora em quantidades vestigiais, foi isolado um bis aducto em 2,5 e um aducto em 6

(Tabela II.4), o próton H6 do bis aducto aparece como um singlete, a 6,91 ppm e os prótons H5 e H2 do aducto em 6 surgem como singlete a 6,76 e 7,01 ppm, respectivamente.^{24, 27, 31}

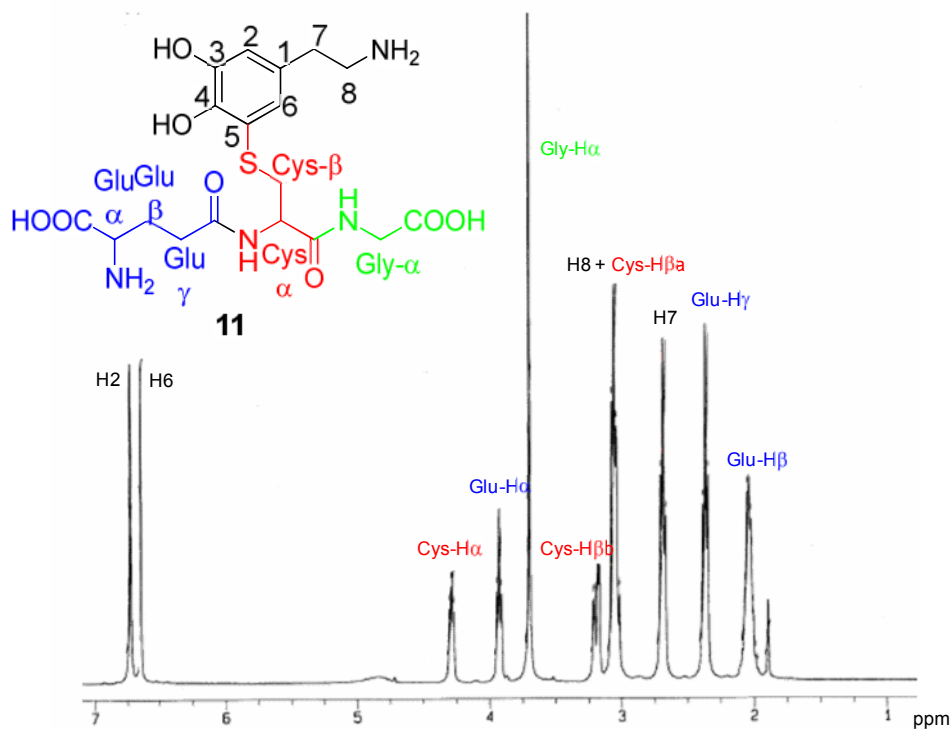


Figura II.3 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 5-GSH-DA (11).

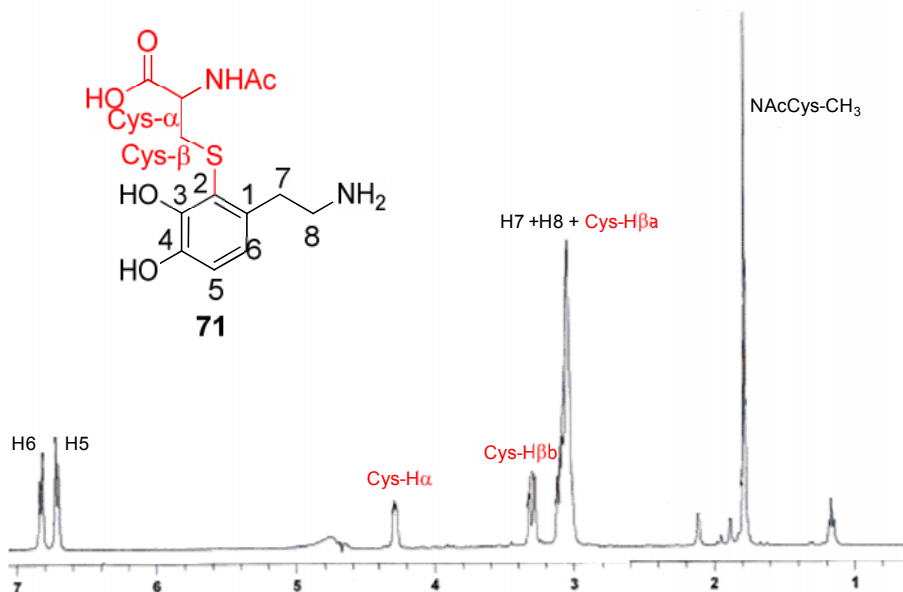
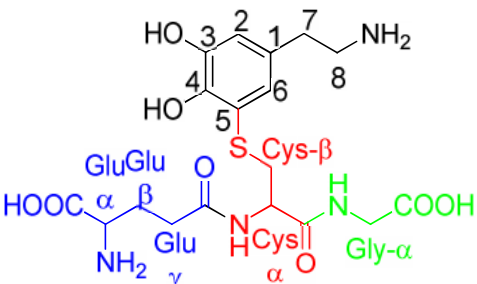
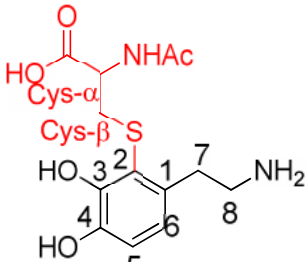


Figura II.4 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 2-NACys-DA (71).

Tabela II.5 - Dados espectroscópicos dos adutos 5-GSH-DA (**11**) e 2-NAcCys-DA (**71**).

¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
1,98-1,99 (2H, m, Glu-Hβ)		
2,34 (2H, t, J= 6,7 Hz, Glu-Hγ)	26,5 (Glu-Cβ)	
2,72 (2H, m, H7)	31,8 (Glu-Cγ)	
3,10-3,12 (3H, m, H8 + Cys-Hβa)	32,3 (C7)	
3,23-3,27 (1H, m, Cys-Hβb)	35,1 (Cys-Cβ)	
3,42-3,52 (2H, m, Gly-Hα)	40,9 (C8)	
3,63-3,64 (1H, m, Glu-Hα)	43,7 (Glu-Cα)	
4,30 (1H, m, Cys-Hα)	53,6 (Cys-Cα)	459 [MH] ⁺
6,68 (1H, s, H6)	54,5 (Gly-Cα)	
6,77 (1H, s, H2)	117,1 (C2/6)	
Estrutura	119,7 (C5)	
	126,0 (C2/6)	
11	129,5 (C1)	
	144,4 (C4)	
	145,0 (C3)	
	171,8, 174,3, 175,1,	
	176,4 (4×CO)	
1,78 (3H, s, NAcCys-CH ₃),	21,7 (NAcCys-CH ₃),	
3,04-3,12 (5H, m, H7 + H8 + Cys-Hβa)	31,4 (C7),	
3,30 (1H, dd, J= 14,1 e 3,4 Hz, Cys-Hβb)	34,5 (Cys-Cβ),	
4,27-4,28 (1H, m, Cys-Hα),	40,6 (C8),	
6,71 (1H, d, J= 8,2 Hz, H5),	53,2 (Cys-α),	
6,82 (1H, d, J= 8,2 Hz, H6)	117,0 (C5),	337 [M + Na] ⁺ ,
Estrutura	117,9 (C2),	315 [MH] ⁺
	121,8 (C6),	
71	132,5 (C1),	
	43,3 (C3/4),	
	146,6 (C3/4),	
	173,8 (NAcCys-CO),	
	174,3 (Cys-CO)	

Além dos prótons aromáticos cujos desvios e acoplamentos são típicos do aducto formado, existem outros prótons relevantes na caracterização dos produtos, como é o caso dos prótons H β da Cys. No espectro de ^1H do composto 5-GSH-DA (**11**), o desvio químico dos prótons da Cys surgem como dois multipletos, a 3,10-3,12 (Cys-H β a) e a 3,23-3,27 (Cys-H β b) ppm (Figura II.3). No espectro de ^1H RMN do produto 2-NAcCys-DA (**71**) o próton H β b da Cys aparece como duplo duplete a 3,30 ppm com constante de acoplamento de 14,1 e 3,4 Hz (Figura II.4 e Tabela II.6). A diferença observada nos desvios químicos dos prótons H β a e H β b da Cys, pode ser explicado tendo em conta que estes prótons não se encontram no mesmo plano, sendo afectados de maneira diferente pelo efeito de corrente criado pelo anel aromático na sua proximidade. Assim, o próton H β b da Cys apresenta maior desblindagem relativamente ao próton H β a, por estar localizado no plano do anel. Outro próton importante em aductos da GSH, é o H α da Gly, uma vez que relativamente à GSH, onde apresenta um desvio de 2,75 ppm, aparece a campo mais baixo ~3,42-3,52 ppm, muito provavelmente porque encontrando-se na zona de desblindagem do anel.

Não é frequente na literatura a caracterização por ^{13}C -RMN dos aductos sulfidrílo da DA.^{11, 24, 25, 27, 31, 35} Contudo, salvo as excepções dos produtos 2,5-di-NAcCys-DA e 6-NAcCys-NADA, isolados em quantidades residuais, os aductos foram caracterizados por ^{13}C -RMN. Como exemplo, apresentamos o espectro de carbono do aducto 5-GSH-NADA (**75**), (Figura II.6), cuja análise foi sustentada pelas experiências bidimensionais de HMQC (Figura II.5) e HMBC (Figura II.7). Os dados espectroscópicos estão apresentados na Tabela II.6.

O espectro de próton foi identificado por analogia ao espectro da 5-GSH-DA (**11**). Para a interpretação dos carbonos, numa primeira aproximação, recorreu-se ao espectro de HMQC, o que permitiu a atribuição da grande maioria dos carbonos. Ou seja, foram atribuídos os carbonos referentes à NADA C2 (126,0 ppm), C6 (117,3 ppm), C8 (40,9 ppm), C7 (34,0 ppm) e o carbono do metilo do grupo acetilo (22,2 ppm). E os carbonos referentes à GSH, C α da Cys (53,6 ppm), C α da Glu (52,7 ppm), C α da Gly (41,4 ppm), C γ da Glu (31,3 ppm) e C β da Glu (25,8 ppm). Os restantes carbonos foram identificados pela análise do espectro de HMBC. Assim sendo, C1 foi atribuído a 132,4 ppm pela correlação com H7 e H8, e C5 foi identificado a 119,4 ppm devido à correlação com os prótons H β da Cys. Não se conseguiu distinguir inequivocamente, os carbonos C3/C4, que surgem com um desvios de 143,6 ou 144,6 ppm. Os grupos carbonilo presentes na molécula foram de seguida atribuídos. A correlação entre os prótons H α e H β da Glu e o grupo carbonilo do ácido carboxílico permitiram a sua atribuição a 171,9 ppm. Em relação ao grupo carbonilo da Cys, foi atribuído a 172,8 ppm, com base na correlação com os respectivos prótons H α e H β . O carbonilo da Gly surge a 173,2 ppm e foi identificado devido à correlação com o H α . O carbonilo do

grupo acetilo apresenta correlação com os prótons H8 e metilo do acetilo, sendo atribuído a 174,3 ppm. Por último foi identificado o carbonilo da Glu, por correlação com o respectivo próton H γ .

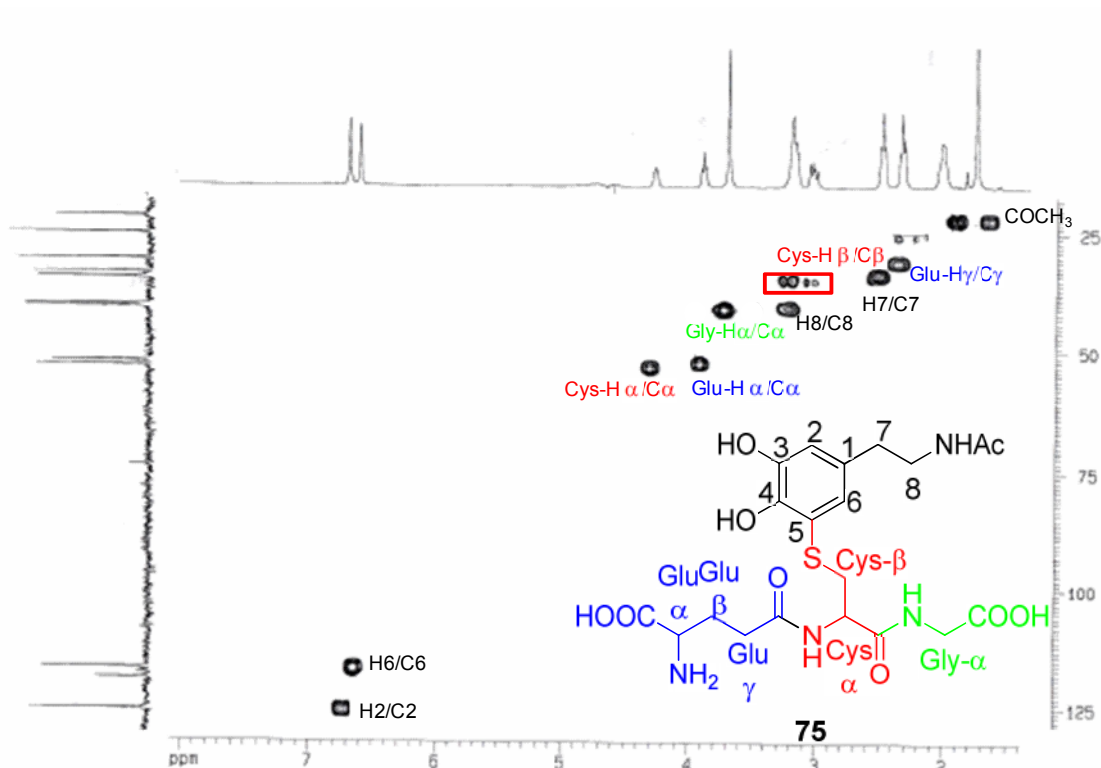


Figura II.5 - Espectro de HMQC do aducto 5-GSH-NADA (75).

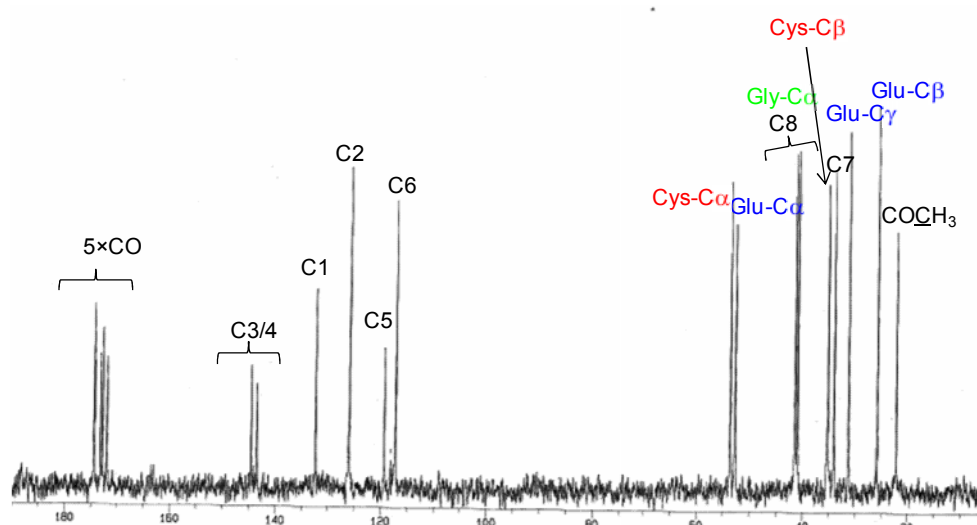


Figura II.6 - Espectro de ^{13}C -RMN do aducto 5-GSH-NADA (75).

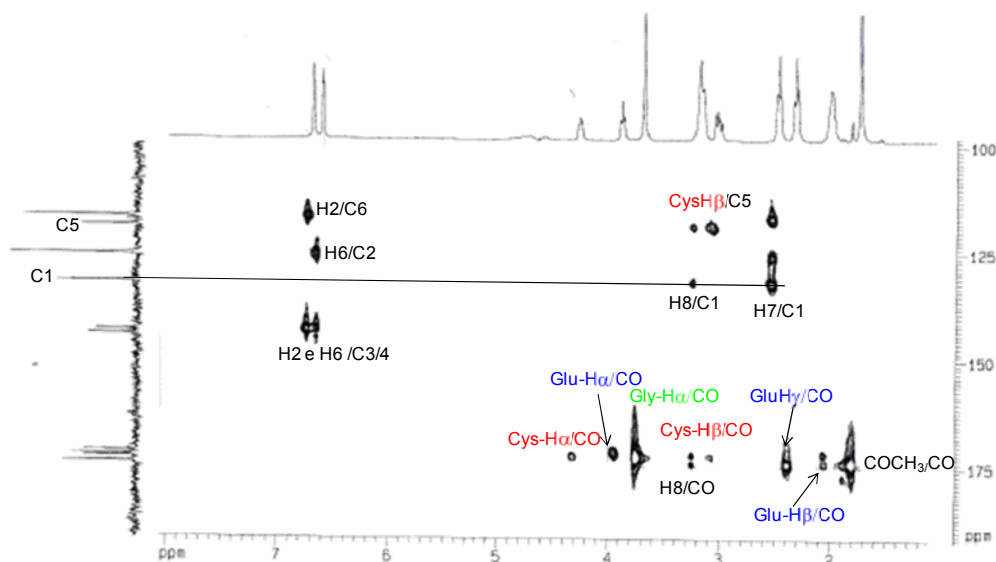
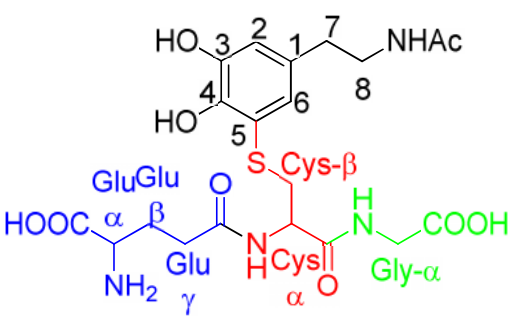


Figura II.7 - Espectro de HMBC do composto 5-GSH-NADA (75).

Tabela II.6 - Dados espectroscópicos dos adutos 5-GSH-NADA (75).

¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
1,80 (3H, s, COCH ₃)	22,2 (COCH ₃)	
2,06 2,07 (2H, m, Glu-Hβ)	25,8 (Glu-Cβ)	
2,34 (2H, t, J= 7,2 Hz, Glu-Hγ)	31,3 (Glu-Cγ)	
2,54 (2H, t, J= 6,4 Hz, H7)	34,0 (C7)	
3,08 (1H, dd, J= 14,3 e 8,4 Hz, Cys-Hβa)	35,2 (Cys-Cβ)	
3,23 (3H, dd, J= 14,3 e 8,4 Hz, H8 + Cys-Hβb)	40,9 (C8)	539 [M + K] ⁺
3,75 (2H, m, Gly-Hα)	41,4 (Gly-Cα)	501 [MH] ⁺
3,94 (1H, t, J= 6,4 Hz, Glu-Hα)	52,7 (Glu-Cα)	
4,32 (1H, dd, J= 7,3 e 4,8 Hz, Cys-Hα)	53,6 (Cys-Cα)	
6,66 (1H, s, H6)	117,3 (C6)	HRMS-ESI
6,74 (1H, s, H2)	119,4 (C5)	(calc.) obtido
Estrutura	126,0 (C2)	C ₂₀ H ₂₉ N ₄ O ₉ S [MH] ⁺
	132,4 (C1)	(501,1655) 501,1650
75	143,6, (C3/4)	
	144,6 (C3/4)	
	171,9 (Glu-CO)	
	172,8 (Cys-CO)	
	173,2 (Gly-CO)	
	174,3 (NADA-CO)	
	174,4 (Glu-CO)	

Os conjugados sulfidrilo das CA em estudo, foram preparados através de uma metodologia simples e eficaz, que permitiu obter num único passo reaccional e com um rendimento bastante razoável o mono-aducto em 5. A aproximação por nós utilizada para a síntese de derivados sulfidrilo da NADA e da DA-Cbz, utilizando a *mushroom tyrosinase* como oxidante, é aqui apresentada pela primeira vez. Contudo, Huang *et al.*, prepararam anteriormente aductos da NADA com a NAcCys, mas *via* oxidação electroquímica da CA.³⁵

Em colaboração com um grupo do departamento de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, foram realizados estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a neurotoxicidade dos compostos 5-GSH-DA, 5-Cys-DA e 5-NAcCys-DA. A investigação encontra-se a decorrer e não foi objecto desta tese.

II.3.2 Preparação por oxidação enzimática de derivados sulfidrilo da MeDA e diMeDA

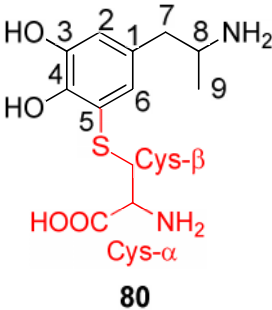
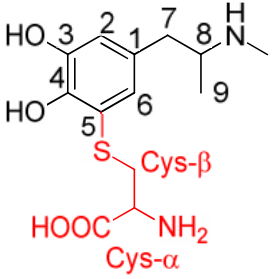
Nos ensaios com diMeDA (**37**) e MeDA (**38**) para preparação de conjugados sulfidrilo, foi utilizado como nucleófilo de enxofre a Cys. A escolha da Cys, deve-se à sua presença em proteínas como a HSA, que foi utilizada em reacções de modificações subsequentes. Foram preparados e caracterizados padrões, que permitiram a monitorização das reacções de modificação de proteínas *in vitro*, por técnicas de espectrometria de massa.

A metodologia utilizada na síntese de aductos da Cys com diMeDA (**37**) e MeDA (**38**), foi semelhante à descrita na secção anterior. A purificação dos aductos, foi realizada no HPLC semi-preparativo, com o programa HPLC-IST-1 (Para o significado da abreviatura cf. secção III.1.2, pág. 150). A t_R de ~ 5 min os compostos apresentavam λ_{max} de ~ 253 e 294 nm, característico de um mono-aducto. Através da análise de 1H -RMN e de ESI-MS comprovou-se tratar-se dos aductos 5-Cys-diMeDA (**47**) e 5-Cys-MeDA (**80**), realizando de seguida os espectros de ^{13}C -RMN e HSQC. Os dados espectroscópicos dos produtos **47** e **80** encontram-se na Tabela II.7.

O espectro de protão do composto 5-Cys-diMeDA (**47**), (Figura II.8), evidencia um padrão aromático típico de um aducto em 5, com dois singletos a 6,74 ppm e 6,89 ppm, referentes a H6 e H2, respectivamente. Os protões do grupo metilo H9 e N-CH₃ surgem a 1,18 ppm e 2,60 ppm, respectivamente; como seria de esperar o protão do grupo metilo adjacente à amina é mais desblindado e aparece a campo mais baixo. À semelhança da multiplicidade apresentada no composto diMeDA (**37**), o protão H7 aparece como duplo duplete a 2,71 ppm (H7a) e 2,82 ppm (H7b). Os protões H α e H β da Cys e o protão H8 foram atribuídos com base nos desvios químicos característicos a 3,69 (Cys-H α), 3,19 (Cys-

H β a), 3,33 ppm (Cys-H β b) e 3,38-3,41 ppm (H8). Os carbonos foram atribuídos pela correlação no espectro de HSQC. Os dados espectroscópicos do produto **47** foram ainda comparados com os apresentados na literatura.⁵⁵ O aducto 5-Cys-MeDA (**80**), foi atribuído de modo análogo ao exposto para o composto **47**.

Tabela II.7 - Dados espectroscópicos dos aductos 5-Cys-MeDA (**80**) e 5-Cys-diMeDA (**47**).

¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	<i>m/z</i>
	17,6 (C9)	287 [MH] ⁺
	35,0 (Cys-Cβ)	HRMS-ESI
1,20 (3H, d, <i>J</i> = 6,4 Hz, H9)	39,2 (C7)	(calc.) obtido
2,64-2,77 (2H, m, H7)	49,0 (C8)	C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₄ S [MH] ⁺
3,16-3,23 (1H, m, Cys-Hβa)	53,5 (Cys-Cα)	(287,0907) 287,1073
3,32 (1H, dd, <i>J</i>= 14,8 e 3,7 Hz, Cys-Hβb)	117,6 (C6)	Estrutura
3,45-3,51 (1H, m, H8)	119,1 (C5)	
3,70 (1H, dd, <i>J</i>= 7,1 e 3,7 Hz, Cys-Hα)	126,4 (C2)	80
6,72 (1H, s, H6)	128,9 (C1)	
6,87 (1H, s, H2)	144,1 (C3/4)	
	144,7 (C3/4)	
	172,2 (Cys-CO)	
	14,8 (C9)	301 [MH] ⁺
	29,9 (N-CH ₃)	HRMS-ESI
1,18 (3H, d, <i>J</i> = 6,4 Hz, H9),	35,1 (Cys-Cβ)	(calc.) obtido
2,60 (3H, s, N-CH ₃)	37,9 (C7)	C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₄ S [MH] ⁺
2,71 (1H, dd, <i>J</i> = 14,0 e 7,2 Hz, H7a)	53,6 (Cys-Cα)	(301,1144) 301,1205
2,82 (1H, dd, <i>J</i> = 12,0 e 6,8 Hz, H7b)	56,3 (C8)	Estrutura
3,19 (1H, dd, <i>J</i>= 14,8 e 8,0 Hz, Cys-Hβa)	117,6 (C6)	
3,33 (1H, dd, <i>J</i>= 14,8 e 4,0 Hz, Cys-Hβb)	119,2 (C5)	47
3,38-3,41 (1H, m, H8)	126,4 (C2)	
3,69 (1H, dd, <i>J</i>= 7,6 e 4,0 Hz, Cys-Hα)	128,4 (C1)	
6,74 (1H, s, H6)	144,4 (C3/4)	
6,89 (1H, s, H2)	144,8 (C3/4)	
	172,3 (Cys-CO)	

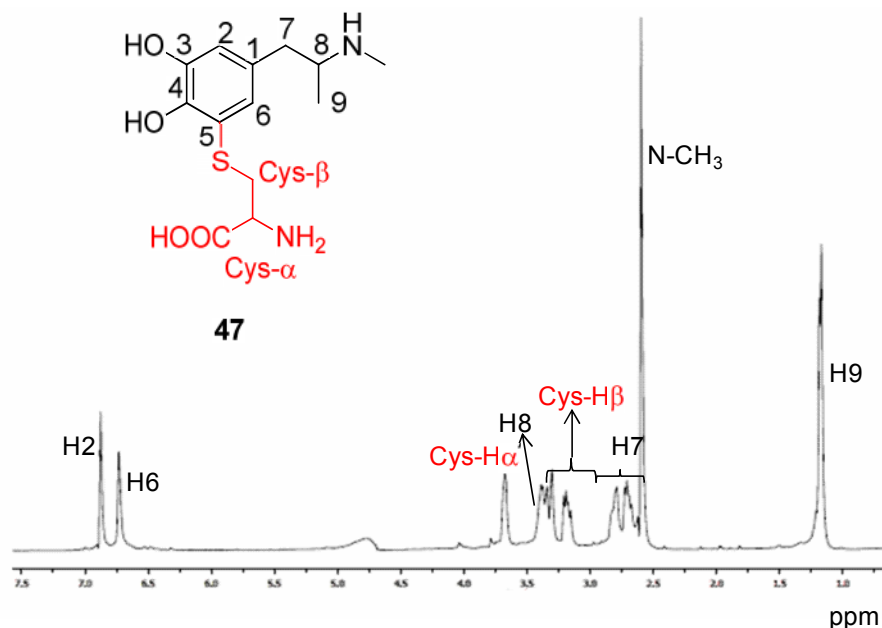


Figura II.8 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 5-Cys-diMeDA (**47**).

A metodologia aqui apresentada para a síntese dos compostos **47** e **80** visa mimetizar as condições fisiológicas. Deste modo a oxidação das CA realizou-se na presença de *mushroom tyrosinase* em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM). Segundo a literatura por nós consultada, o composto 5-Cys-MeDA (**80**) é aqui apresentado pela primeira vez, e o aducto 5-Cys-diMeDA (**47**) foi anteriormente sintetizado por oxidação eletroquímica.⁵⁵ Os produtos **80** e **47** foram isolados com um rendimento 55 % e 18 %, respectivamente. Verificou-se uma menor eficiência nas reacções, em comparação com os rendimentos de 82 % e 72 %, dos aductos 5-Cys-DA (**12**) e 5-Cys-NADA (**21**), respectivamente. No entanto, a eficiência foi próxima da apresentada na preparação da molécula 5-Cys-DA-Cbz (**79**), 50 %. Estes resultados indicam que os metabolitos MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), e a DA-Cbz (**60**) são menos reactivos. Dada a semelhança estrutural entre os electrófilos, a diferença de eficiência observada poderá estar relacionada com o maior impedimento estereoquímico dos electrófilos.

II.3.3 Preparação por oxidação química de derivados sulfidrilo de CA

Foi investigada a preparação de aductos da GSH, NAcCys e Cys com as CA, DA (**1**), NADA (**20**) e DA-Cbz (**60**), usando os oxidantes químicos NaIO_4 (1 eq.), Sal de Frémy (1 eq.) e Ag_2O (10 eq.). Os ensaios realizados estão apresentados na Tabela II.8 e permitiram comparar a eficiência selectiva dos oxidantes utilizados.

Tabela II.8 - Produtos das reacções de oxidação química da DA, NADA e DA-Cbz com os nucleófilos GSH, NAcCys e Cys.

CA	Ox./Nuc.	Produtos identificados	η (%)
DA	NaIO_4/GSH	5-GSH-DA (11)	7
DA	$\text{NaIO}_4/\text{NAcCys}$	5-NAcCys-DA (72)	11
DA	Sal de Frémy/GSH	-*	
DA	Sal de Frémy/NAcCys	5-NAcCys-DA (72) dímero NAcCys (81)	1
DA	Sal de Frémy/Cys	-*	
DA	Ag_2O NAcCys	5-NAcCys-DA (72)	2
NADA	NaIO_4/GSH	2-GSH-NADA ^{a)} (82)	6
		5-GSH-NADA (75)	17
		2,5-GSH-NADA ^{a)} (83)	10
		dímero GSH (84)	
NADA	$\text{NaIO}_4/\text{NAcCys}$	5-NAcCys-NADA (21)	6
		2,5-NAcCys-NADA (23)	2
		dímero NAcCys (81)	
NADA	NaIO_4/Cys	5-Cys-NADA (76)	4
		dímero Cys (15)	
NADA	Sal de Frémy/GSH	5-GSH-NADA (75) dímero GSH** (84)	11
NADA	Sal de Frémy/NAcCys	5-NAcCys-NADA (21) dímero NAcCys (81)	24
NADA	Sal de Frémy/Cys	5-Cys-NADA (76)	3
		2,5-Cys-NADA ^{a)} (85)	2
NADA	$\text{Ag}_2\text{O}/\text{NAcCys}$	5-NAcCys-NADA (21)	3
DA-Cbz	NaIO_4/GSH	5-GSH-DA-Cbz (77)	13

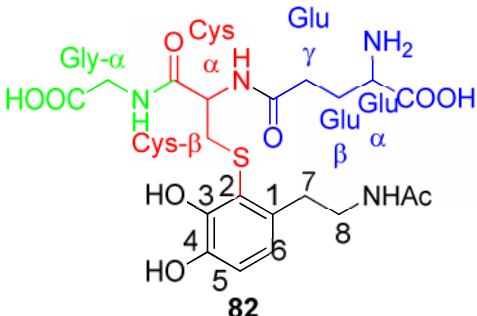
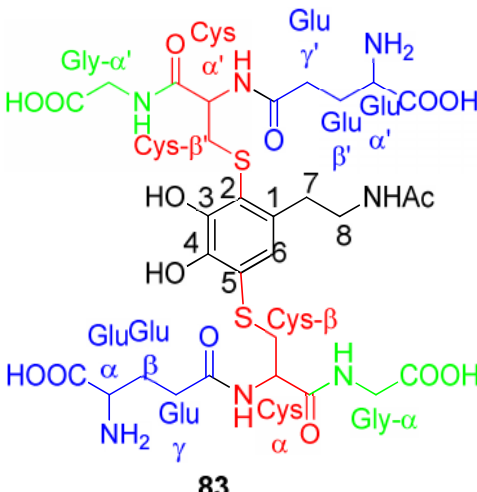
-* A presença de aducto não foi detectada no HPLC analítico, - ** Composto identificado por ESI.

-^{a)} Composto novo.

A aproximação utilizada foi semelhante à realizada para a oxidação com *mushroom tyrosinase*, num primeiro passo realizou-se a oxidação da CA, e de seguida adicionou-se o nucleófilo de enxofre. De modo a detectar a formação do aducto, as reacções foram seguidas no HPLC analítico, usando o programa HPLC-IST-2 (Para o significado da abreviatura cf. secção III.1.2, pág. 150). No final as reacções foram purificadas no HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-IST-1. Foi isolado como produto maioritário o mono-aducto em 5 (Tabela II.8); no entanto, nalgumas reacções foi ainda recolhido o aducto em 2 ou o bis aducto em 2,5, o respectivo dímero do nucleófilo de enxofre, e material de partida (Tabela II.8). Os compostos foram caracterizados por ^1H -RMN e por ESI-MS.

Na reacção da NADA (**20**) na presença de NaIO_4 e GSH, foram isolados os produtos 2-GSH-NADA (**82**) (6 %), 5-GSH-NADA (**75**) (17 %), 2,5-GSH-NADA (**83**) (10 %), o dímero da GSH (**84**), e ainda material de partida. De referir que o aducto em 2 e o bis aducto, são aqui apresentados pela primeira vez. Os espectros de protão foram atribuídos por comparação com espectros de aductos semelhantes apresentados na secção anterior ou descritos na literatura (Tabela II.9).³¹ De salientar que os sinais da zona aromática foram determinantes para a atribuição da estrutura. No aducto em 2 (**82**), H5 e H6 surgem como duplete a 6,85 ppm ($J = 8,0$ Hz) e 6,84 ppm ($J = 8,4$ Hz), com constantes de acoplamento típicas de protões *orto* (Tabela II.9). E no bis aducto (**83**) o protão H6 aparece como singleto a 6,85 ppm. Na reacção da NADA (**20**) com Sal de Frémy e Cys, foi isolado outro composto novo o bis aducto 2,5-Cys-NADA (**85**).

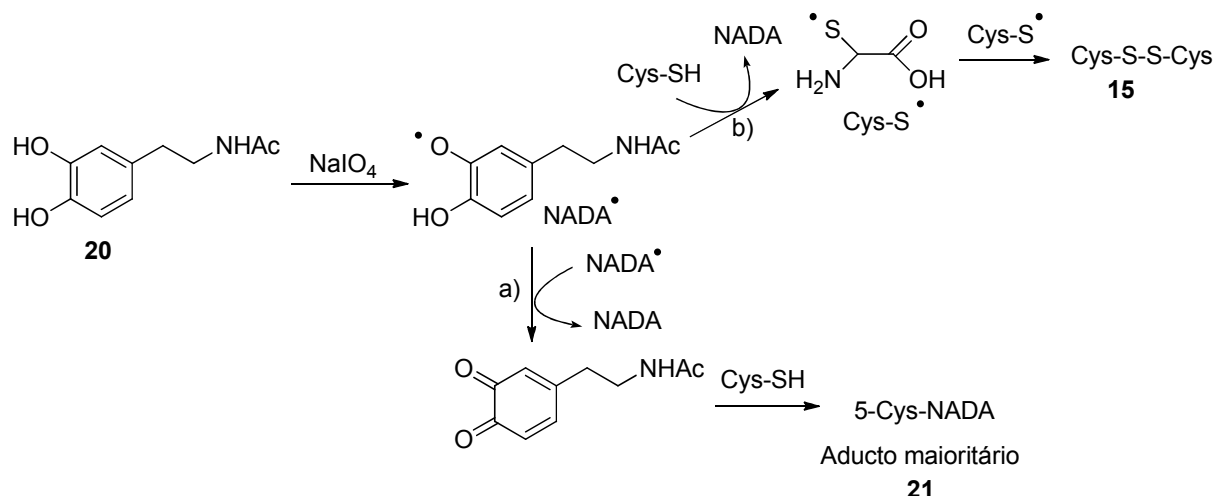
Tabela II.9 - Dados de espectroscópicos dos aductos 2-GSH-NADA (**82**) e 2,5-GSH-NADA (**83**).

¹ H-RMN (D ₂ O) δ (ppm)	MS (ESI) m/z
1,81 (3H, s, COCH ₃)	501 [MH] ⁺
1,90-2,19 (2H, m, Glu-Hβ)	Estrutura
2,34-2,38 (2H, m, Glu-Hγ)	
2,70-3,38 (6H, m, Cys-Hβ + H7 + H8)	
3,62-3,89 (3H, m, Glu-Hα + Gly-Hα)	
4,24-4,25 (1H, m, Cys-Hα)	
6,85 (1H, d, J= 8,0 Hz, H5)	
6,84 (1H, d, J= 8,4 Hz, H6)	
	828 [M + Na] ⁺
1,80 (3H, s, COCH ₃)	806 [MH] ⁺
2,00-2,06 (4H, m, Glu-Hβ + Glu-Hβ')	Estrutura
2,34-2,44 (4H, m, Glu-Hγ + Glu-Hγ')	
2,75-3,31 (8H, m, Cys-Hβ + Cys-Hβ' + H7 + H8)	
3,73-3,88 (6H, m, Glu-Hα + Glu-Hα' + Gly-Hα + Gly-Hα')	
4,19 (1 H, dd, J= 8,8 e 4,4 Hz, Cys-Hα ou Cys-Hα')	
4,31 (1 H, dd, J= 8,4 e 4,8 Hz, Cys-Hα' ou Cys-Hα)	
6,85 (1H, s, H6)	

O dímero da Cys, NAcCys e GSH, não foi identificado aquando as oxidações com *mush-room tyrosinase*. Nestas reacções a transferência de dois electrões, para a formação da o-quinona, ocorreu num único passo. Segundo Nicolis *et al.*, a formação de espécies diméricas é uma indicação que o mecanismo da reacção é radicalar.³¹

Os resultados apresentados na Tabela II.8, podem ser explicados através de um processo de transferência de dois electrões, onde ocorre primeiro a transferência de um electrão, com formação da semi-quinona, e depois outro, com a concomitante formação da o-quinona. No Esquema II.5, encontra-se exemplificado o mecanismo proposto para a reacção de oxidação da NADA (**20**) com NaIO₄, seguida da adição de Cys. Assim sendo, num primeiro passo ocorre a formação da semi-quinona (Esquema II.5), podendo depois ocorrer a formação da respectiva o-quinona, que ao sofrer ataque da Cys forma o respectivo aducto em

5 (**21**), (Esquema II.5a). Por outro lado, a semi-quinona pode oxidar uma molécula Cys formando-se o respectivo dímero (**15**) e regenerando-se material de partida (Esquema II.5b).



Esquema II.5 - Mecanismo proposto para a formação de conjugados de enxofre de CA usando NaIO_4 ou Sal de Frémy, exemplificado para a NADA (**20**) e a Cys, via a) Formação do dímero (**15**), b) formação do aduto maioritário (**21**).

Suportando, o mecanismo por nós proposto para o NaIO_4 Esquema II.5, onde ocorre a formação da semi-quinona. Jameson *et al.*, estudaram a oxidação da 6-hidroxi-dopamina na presença de NaIO_4 , e verificaram que apesar do NaIO_4 ser um oxidante de transferência de dois electrões, a transferência não ocorre em simultâneo.¹²⁰

Land e colaboradores observaram que a NADA semi-quinona é uma espécie bastante instável, uma vez que, em poucos milissegundos (ca. 10 ms) origina a respectiva o-quinona.¹¹⁹ Deste modo, detectar a semi-quinona por ^1H -RMN ou UV/Vis, torna-se improvável (secção II.5, pág. 68). Reacções entre a semi-quinona e o radical da Cys não podem ser excluídas, contudo tendo em conta os produtos isolados a probabilidade de tal reacção ocorrer é baixa.

Nas reacções da NADA com $\text{NaIO}_4/\text{NACys}$, Sal de Frémy/Cys e NaIO_4/GSH foram isolados como resultado da re-oxidação do mono-aducto em 5 os respectivos bis aductos (**83**), (**23**) e (**85**). A formação dos bis aductos assim como do dímero da Cys, NACys ou GSH, apontam para o baixo rendimento destas reacções, em comparação com o processo enzimático, claramente mais satisfatório (Tabela II.4).

Entre os oxidantes químicos utilizados, NaIO_4 , Sal de Frémy e Ag_2O , o Ag_2O revelou-se o menos eficiente, uma vez que os produtos isolados tiveram um rendimento substancialmente mais baixo (Tabela II.8).

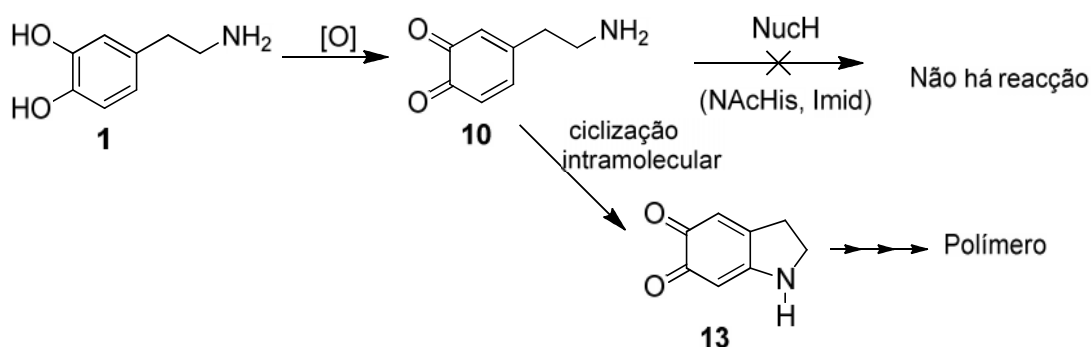
II.3.4 Em Resumo:

- Na preparação de tio-conjugados de CA, a oxidação foi realizada por um oxidante químico (NaIO_4 , Sal de Frémy e Ag_2O) ou enzimático (*mushroom tyrosinase*), em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) com subsequente adição de 5 eq. de nucleófilo (GSH, NAcCys e Cys).
- O mono-aducto em 5 foi o composto maioritário das reacções, contudo nalguns casos foram isolados aductos em 2 e/ou bis aductos em 2,5.
- Os rendimentos apresentados nas reacções de oxidação enzimática da CA, para preparação de conjugados de enxofre, variaram entre moderados e bons, demonstrando uma maior eficiência destas reacções, face às reacções de oxidação química da CA.
- É proposto um mecanismo para as reacções de oxidação química das CA, onde a oxidação da CA ocorre em dois passos, com formação da semi-quinona (por transferência de um electrão) e posteriormente formação da o-quinona (novamente por transferência de um electrão). Este tipo de mecanismo justifica o baixo rendimento das reacções, assim como a formação de produtos laterais, tais como os que resultam da dimerização do nucleófilo de enxofre, a formação de bis aducto e a recuperação de material de partida.
- Dos oxidantes químicos utilizados, NaIO_4 , Sal de Frémy e Ag_2O , este último foi aquele que apresentou rendimentos inferiores para o aducto em 5.

II.4 Preparação e caracterização de derivados de azoto de CA

II.4.1 Preparação e caracterização de derivados de azoto da DA e NADA

Numa primeira aproximação para a síntese de conjugados de azoto, realizou-se a reacção entre a DA e a NAcHis. A estratégia sintética foi semelhante à realizada para os nucleófilos de enxofre: após a formação da quinona adicionou-se o nucleófilo de azoto. No entanto, minutos depois a mistura reaccional adquiriu uma coloração negra, cor característica do polímero da melanina, originado a partir da reacção de ciclização intramolecular na DA (Esquema II.6).

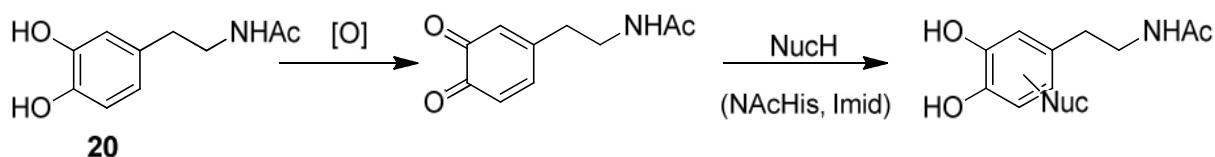


Esquema II.6- Reacção da DA (1) com os nucleófilos de azoto, NAcHis e Imid.

O mesmo procedimento foi executado para os nucleófilos de azoto Imid, NAcLys, His e Lys, e uma vez mais, não houve reacção intermolecular. Tse *et al.*, verificaram que a reacção de ciclização intramolecular na DA é mais rápida que a reacção intermolecular, com excepção para os nucleófilos de enxofre Cys e GSH.³³ Nicolis e colaboradores, referem ainda que a velocidade da reacção entre a DAQ e a NAcCys é $\sim 10^6$ vezes superior à velocidade da reacção entre a DAQ e a NAcHis.³¹

Assim sendo, uma nova estratégia sintética seria necessária para a preparação de derivados de azoto de 1. De modo a evitar as reacções de ciclização intramolecular que ocorrem com a DA, foi investigado o derivado *N*-substituído a NADA (20). Realizou-se a reacção entre a NADA-quinona, gerada com *mushroom tyrosinase*, NaIO₄ (1 eq.), Sal de Frémy (1 eq.), ou Ag₂O (10 eq.), e os nucleófilos de azoto NAcHis e Imid (Esquema II.7 e Tabela II.10). No final, adicionou-se ác. fórmico 88 %. Para retirar o excesso de nucleófilo realizou-se uma c.c. RP-18 usando como gradiente H₂O (100 mL) e H₂O/MeOH (1:1) (100 mL), e o produto foi purificado por HPLC semi-preparativo, com o programa HPLC-FCT-1. Na Tabela II.10, estão apresentados os aductos isolados, com os respectivos rendimentos. Foram ainda investigados os nucleófilos de azoto, Lys, His e NAcLys, mas independentemente dos

oxidantes utilizados, os resultados não foram promissores, uma vez que, não foram isolados aductos destas reacções.

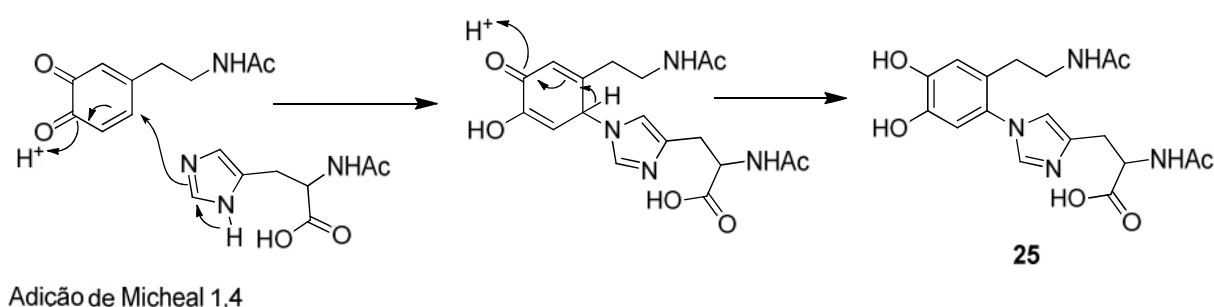


Esquema II.7 - Reacção entre a NADA (**20**) e os nucleófilos de azoto NAcHis e Imid.

Tabela II.10 - Produtos das reacções entre a NADA-quinona e os nucleófilos NAcHis e Imid.

Ox./Nuc.	Produtos identificados	η (%)
Ty/NAcH (10 eq.)	2-NAcHis-NADA (27)	2
	6-NAcHis-NADA (25)	16
NaIO ₄ /NAcH (10 eq.)	6-NAcHis-NADA (25)	10
Sal de Frémy/NAcH (5 eq.)	6-NAcHis-NADA (25)	4
Ag ₂ O/NAcH (5 eq.)	6-NAcHis-NADA (25)	2
Ty/Imid (10 eq.)	6-Imid-NADA (29)	15
NaIO ₄ / Imid (10 eq.)	6-Imid-NADA (29)	10

As reacções da NADA com NAcHis e Imid, são regioselectivas, sendo o composto maioritário o aducto em 6 (Tabela II.10), formado através de uma reacção de adição de Michael 1,4 (Esquema II.8). Na reacção da NADA com a NAcHis, usando *mushroom tyrosinase* como oxidante, foi também isolado o aducto em 2. De referir, que independentemente do oxidante utilizado, os rendimentos das reacções são baixos (Tabela II.10), indicando que o mecanismo de formação da *o*-quinona, via transferência simultânea de dois electrões (*tyrosinase*) ou por duas transferências sucessivas de um electrão, com formação da semi-quinona, não influencia o rendimento da reacção. Provavelmente o baixo rendimento deve-se aos nucleófilos utilizados.



Esquema II.8 - Mecanismo de adição de Michael 1,4 entre a NAcHis e a NADA-quinona.

Os compostos 6-NAcH-NADA (**25**), 2-NAcH-NADA (**27**) e 6-Imid-NADA (**29**), foram caracterizados por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, e ESI-MS. Foram ainda realizadas experiências bidimensionais de HMQC e HMBC. A interpretação dos espectros foi realizada por comparação com a literatura, uma vez que Xu *et al.* caracterizaram estes compostos preparados por oxidação electroquímica da NADA.^{37, 39} NA Tabela II.11 estão apresentados os dados espectroscópicos dos aductos 6-NAcH-NADA (**25**), e 6-Imid-NADA (**29**), e na Tabela II.12 do produto 2-NAcH-NADA (**27**).

A primeira evidência da formação do aducto 6-NAcH-NADA (**25**) foi obtida pelo espectro de protão (Figura II.9). Os protões da zona aromática, que indicam o tipo de aducto formado, surgem como singleto a 6,80 ppm, integrando para dois protões, em conformidade com a adição do nucleófilo na posição 6 do anel aromático. O protão do grupo metileno da NADA, H7, aparece como um multipeto, a campo característico (2,36-2,44 ppm). Foram ainda atribuídos os protões da NAcHis, H5 e H2, que surgem como um singleto a 7,38 e 8,74 ppm, respectivamente. No espectro de HMQC a correlação destes protões, permitiu a atribuição dos respectivos carbonos (Figura II.10). A atribuição dos restantes protões foi suportada pela análise dos espectros de HMQC (Figura II.10) e HMBC (Figura II.11).

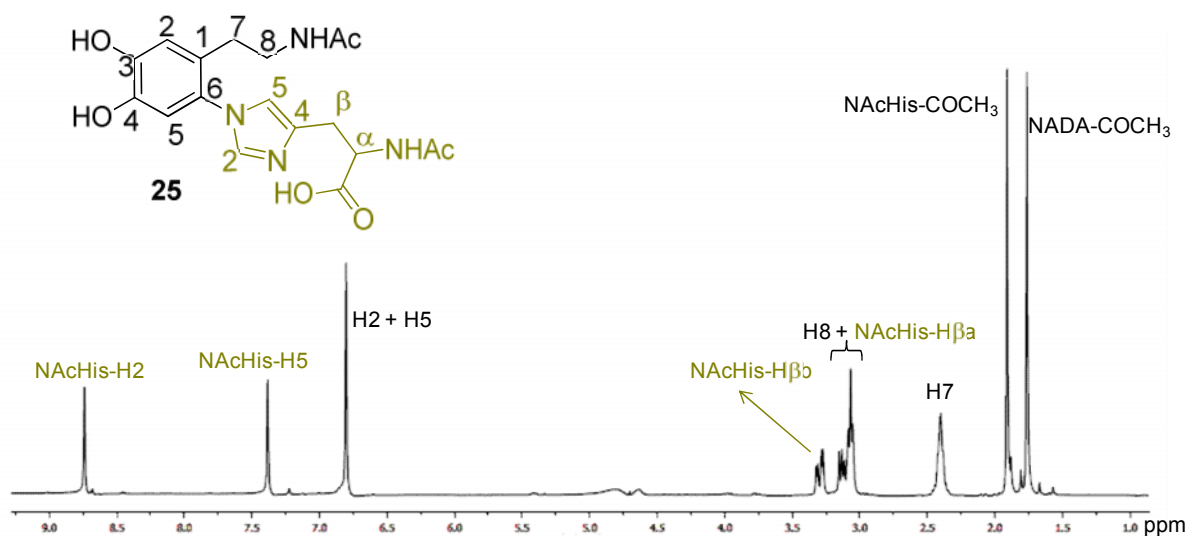


Figura II.9 - Espectro de ^1H -RMN do aducto 6-NAcHis-NADA (**25**).

No espectro de HMQC (Figura II.10), a correlação do sinal do carbono a 39,9 ppm (C8), permitiu a atribuição do protão H8, integrado dentro do multipeto a 3,05-3,15 ppm. O carbono C β da NAcHis atribuído a 26,8 ppm apresenta correlação com os sinais a 3,05-3,15 (NAcHis-H β a) e 3,30 ppm (NAcHis-H β b), demonstrando um carácter diastereotópico destes protões metilénicos. A correlação entre o sinal do C α da NAcHis a 52,2 ppm permitiu a iden-

tificação do respectivo próton a *ca.* 4,70 ppm, não detectado no espectro de próton, por se encontrar na zona de irradiação do sinal da água.

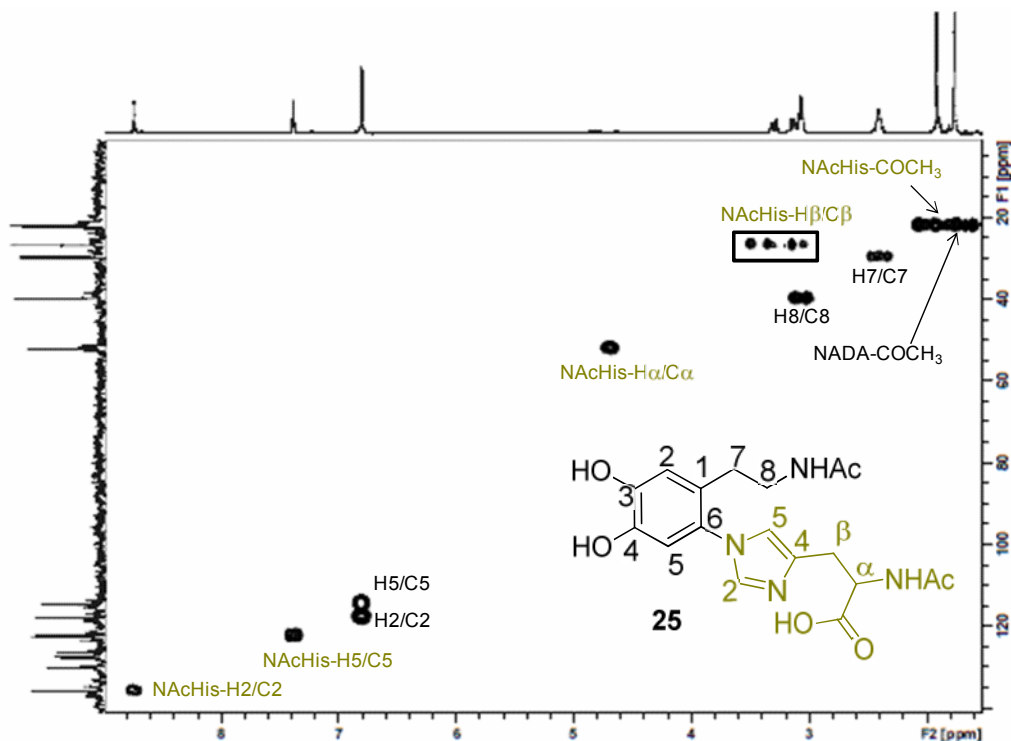


Figura II.10 - Espectro de HMQC do aducto 6-NAcHis-NADA (**25**).

No espectro de HMBC (Figura II.11), a correlação de H7 com C2, permitiu distinguir os carbonos C2 e C5 detectados a 117,9 ppm e 114,7 ppm, respectivamente. A correlação do H α da NAcHis com COCH_3 (NAcHis), e a correlação de H8 com COCH_3 (NADA) permitiu distinguir estes carbonilos com ressonâncias de 173,4 ppm e 174,3 ppm, respectivamente.

Realizou-se ainda um espectro de NOESY, onde foram identificadas com intensidades semelhantes, as correlações entre os prótons H8 e H7 com os prótons da NAcHis H5 e H2, sugerindo que os prótons metilénicos da NADA, são equidistantes dos prótons H5 e H2 da NAcHis, indicando uma substituição no N1.

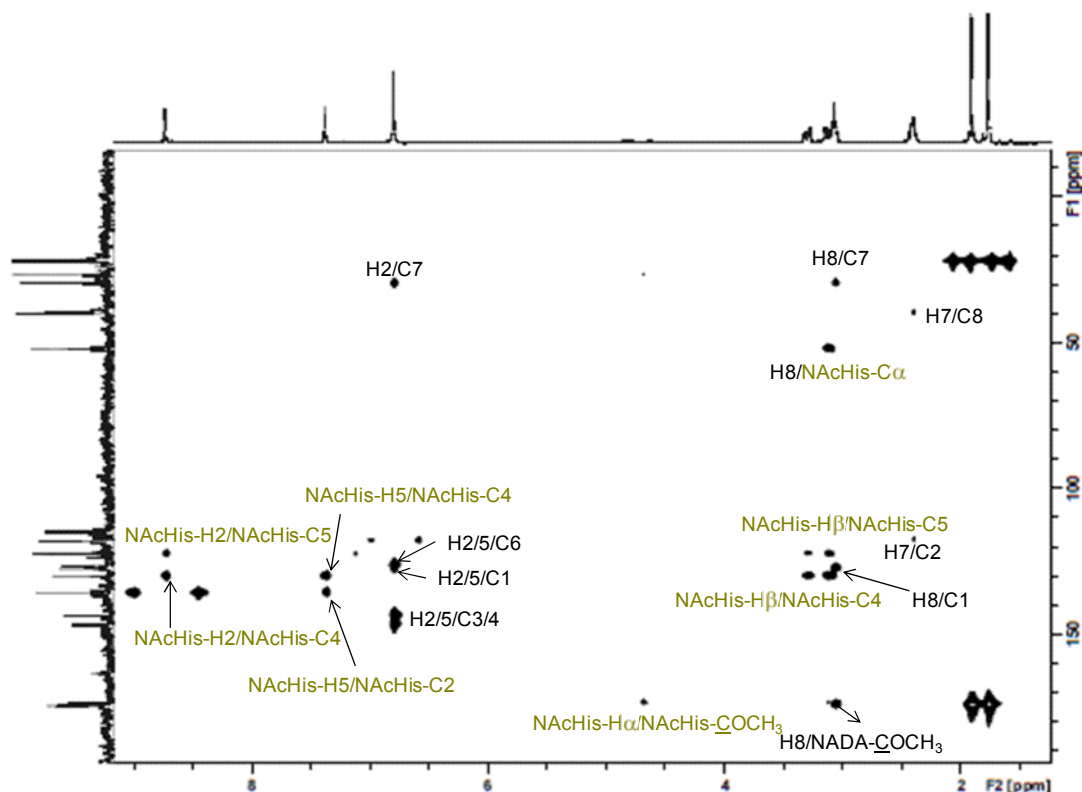
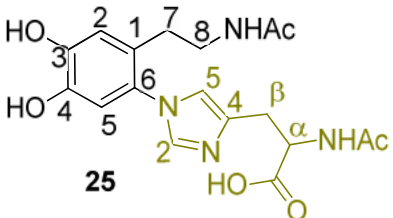
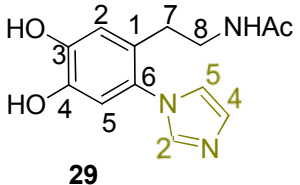


Figura II.11 - Espectro de HMBC do aducto 6-NAcHis-NADA (**25**).

O aducto 6-Imid-NADA (**29**), (Tabela II.11), foi identificado de modo análogo ao exposto para o composto **25**. Estes compostos foram anteriormente referidos na literatura, preparados por oxidação electroquímica da NADA.^{37, 39} Ao confrontar os desvios no espectro de próton do composto **29** com os da literatura,³⁷ verificou-se que havia um desvio de >1 ppm no próton H2. Enquanto Xu *et al.* apresentam só o espectro de próton,³⁷ os espectros de ¹³C-RMN, HMQC e HMBC aqui apresentados permitiram uma atribuição inequívoca do composto **29**.

O aducto 2-NAcH-NADA (**27**), (Tabela II.12), foi identificado através da análise dos espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMQC, HMBC e ESI-MS, e por comparação com a literatura.³⁹ O espectro de próton do composto **27** (Figura II.12), revelou um padrão mais complexo relativamente ao apresentado pelo aducto 6-NAcHis-NADA (**25**) (Figura II.9). Alguns prótons, estão presentes em pares (Figura II.12), revelando a existência de conformeros. Os prótons afectados são NADA-COCH₃, NAcHis-COCH₃, NAcHis-H α , H6 e NAcHis-H5 (Figura II.12 e Tabela II.12). De referir que no espectro de HMBC o próton H7 só apresenta correlação para um -CH aromático a 126,4 ppm, o C6, que evidencia que o ataque nucleófilo ocorreu no C2 do anel aromático.

Tabela II.11 - Dados espectroscópicos do aducto 6-NAcH-NADA (**25**) e 6-Imid-NADA (**29**)

¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
1,78 (3H, s, NADA-COCH ₃)	22,1 (NADA-COCH ₃ + NAcHis-CH ₃)	
1,91 (3H, s, NAcHis-COCH ₃)		
2,36-2,44 (2H, m, H7)	26,8 (NAcHis-Cβ)	
3,05-3,15 (3H, m, H8 + NAcHis-Hβa)	29,7 (C7)	
3,30 (1H, dd, J= 15,4 e 5,0 Hz, NAcHis-Hβb)	39,9 (C8)	
ca. 4,70 (NAcHis-Hα)	52,2 (NAcHis-Cα)	
6,80 (2H, s, H2/5)	114,7 (C5)	391
7,38 (1H, s, NAcHis-H5)	117,9 (C2)	[MH] ⁺
8,74 (1H, s, NAcHis-H2)	123,5 (NAcHis-C5)	
	126,4 (C6)	
	127,5 (C1)	
	130,1 (NAcHis-C4)	
	135,9 (NAcHis-C2)	
	143,6, 146,6 (2×C3/4)	
	163,6 (NAcHis-CO)	
	173,4 (NAcHis-COCH ₃)	
	174,3 (NADA-COCH ₃)	
Estrutura		
 <p>25</p>		
1,78 (3H, s, COCH ₃)	22,1 (COCH ₃)	
2,45 (2H, t, J= 6,6 Hz, H7)	29,6 (C7)	
3,11 (3H, t, J= 6,5 Hz, H8)	40,1 (C8)	
6,84 (1H, s, H5)	114,7 (C5)	284
6,85 (1H, s, H2)	117,8 (C2)	[M + Na] ⁺
7,54 (2H, s, Imid-H5/4)	120,1 (Imid-C4/5)	
8,82 (1H, s, Imid-H2)	124,4 (Imid-C4/5)	262 [MH] ⁺
	126,4 (C6)	
	127,6 (C1)	
	135,9 (Imid-C2)	
	143,5 (C3/4)	
	146,6 (C3/4)	
	174,3 (COCH ₃)	
Estrutura		
 <p>29</p>		

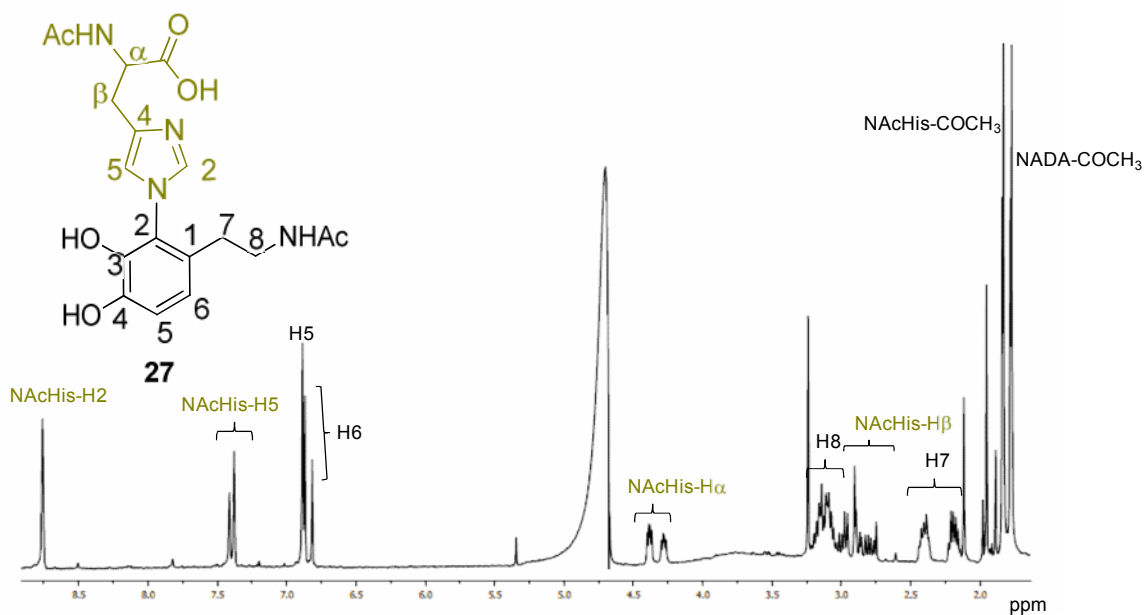


Figura II.12 - Espectro de ^1H -RMN do aduto 2-NAcHis-NADA (**27**).

Tabela II.12 - Dados espectroscópicos do aduto 2-NAcH-NADA (**27**).

^1H -RMN (D_2O)	^{13}C -RMN (D_2O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
1,77, 1,78 (3H, s, NADA- COCH_3)	22,6 (NADA- COCH_3 +	
1,83, 1,84 (3H, s, NAcHis- COCH_3)	NAcHis- CH_3)	
2,12-2,23, 2,39-2,42 (2H, m, H7)	26,1 (NAcHis- $\text{C}\beta$)	
2,74-2,99 (2H, m, NAcHis- $\text{H}\beta$)	30,3 (C7)	
3,01-3,14 (1H, m, H8)	40,7 (C8)	
4,28 (1H, dd, $J = 8,6$ e $5,2$ Hz, NAcHis- $\text{H}\alpha$)	52,8 (NAcHis- $\text{C}\alpha$)	
4,38 (1H, dd, $J = 8,2$ e $4,7$ Hz, NAcHis- $\text{H}\alpha'$)	116,5 (C6)	
6,81, 6,87 (1H, s, H6)	118,5 (C5)	391
6,88 (1H, s, H5)	119,2 (NAcHis- C5)	$[\text{MH}]^+$
7,38, 7,41 (1H, s, NAcHis- H5)	123,1 (C1)	
8,76 (1H, s, NAcHis- H2)	127,9 (C2)	
Estrutura	131,5 (NAcHis- C4)	
	135,8 (NAcHis- C2)	
	143,6 (C3/4)	
	146,7 (C3/4)	
	163,6 (NAcHis- CO)	
	173,8 (NAcHis- COCH_3 + NADA- COCH_3)	

De modo a obter os respectivos derivados da DA, os aductos 6-NAcHis-NADA (**25**) e 6-Imid-NADA (**29**), foram sujeitos a condições de hidrólise ácida. Na hidrólise do composto **29** obteve-se o produto (6-*N*-Imidazol-*N*1'-il)-dopamina (**86**, 6-Imid-DA) com 40 % de rendimento, e os dados espectroscópicos estão apresentados na Tabela II.13. Relativamente à hidrólise do aducto **25** foram obtidos os produtos (6-Histidin-*N*1'-il)-dopamina (**87**, 6-His-DA) e (6-Histidin-*N*1'-il)-*N*-acetildopamina (**88**, 6-His-NADA) com rendimentos de 27 % e 21 %, respectivamente e cujos dados espectroscópicos estão apresentados na Tabela II.14.

Relativamente ao composto 6-Imid-DA (**86**), a perda do acetilo foi verificada aquando da análise do espectro de ^1H -RMN, pela ausência dos prótons do grupo metilo, que surgem como um singlete a $\sim 1,78$ ppm. No espectro de ESI-MS o ião protonado a m/z 220, também evidência a perda de 42 unidades relativamente ao aducto 6-Imid-NADA (**29**), característica da perda do grupo ceteno.

No aducto 6-His-DA (**87**), o espectro de próton revelou a ausência dos prótons dos grupos metilo dos dois grupos acetilo, evidenciando uma hidrólise total. No espectro de ESI, o aducto protonado a m/z de 307 também demonstra a perda de dois grupos cetenos (84 unidades), relativamente ao composto 6-NAcHis-NADA (**25**), (391 m/z).

O espectro de massa do aducto protonado 6-His-NADA (**88**) apresenta m/z de 349, que está de acordo com a perda de um grupo ceteno relativamente à molécula 6-NAcHis-NADA (**25**). Contudo, foi o espectro de próton que permitiu distinguir qual dos acetilos (NADA ou NAcHis) sofreu hidrólise. O singlete a 1,78 ppm é indicativo da presença do grupo acetilo da NADA, revelando que a hidrólise ocorreu no acetilo da NAcHis. Tanto quanto nos foi possível concluir pela consulta exhaustiva da literatura, os compostos 6-Imid-DA (**86**), 6-His-DA (**87**) e 6-His-NADA (**88**) são aqui apresentados pela primeira vez.

Tabela II.13 - Dados espectroscópicos do aducto 6-Imid-DA (**86**).

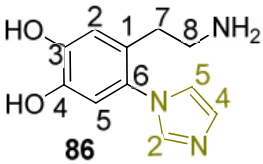
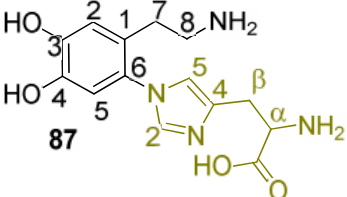
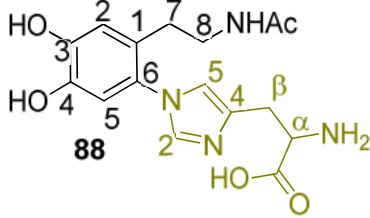
Estrutura	^1H -RMN (D_2O) δ (ppm)	MS (ESI) m/z	HRMS-ESI (calc.) obtido
 86	2,64 (2H, t, $J = 8,0$ Hz, H7)		
	2,98 (3H, t, $J = 7,9$ Hz, H8)		$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{MH}]^+$
	6,90 (1H, s, H2/5)	220 $[\text{MH}]^+$	(220,1081)
	6,91 (1H, s, H2/5)		220,1081
	7,56 (2H, s, Imid-H5/4)		
	8,86 (1H, s, Imid-H2)		

Tabela II.14 - Dados espectroscópicos dos aductos 6-His-DA (**87**) e 6-His-NADA (**88**).

¹ H-RMN (D ₂ O)	¹³ C-RMN (D ₂ O)	MS (ESI)
δ (ppm)	δ (ppm)	m/z
2,61 (2H, t, J= 7,7 Hz, H7)	26,1 (His-Cβ),	307 [MH] ⁺
2,98 (2H, t, J= 7,7 Hz, H8)	27,6 (C7),	
3,26 (2H, dd, J= 15,5 e 7,4 Hz, His-Hβa)	39,9 (C8),	
3,35 (2H, dd, J= 15,4 e 5,8 Hz, His-Hβb)	53,7 (His-Cα),	
4,04 (1H, t, J= 7,7 Hz, His-Hα)	115,1 (C5),	
6,89 (2H, s, H2/5)	117,4 (C2),	HRMS-ESI (calc.) obtido C ₁₄ H ₁₉ N ₄ O ₄ [MH] ⁺ (307,1401) 307,1401
6,90 (2H, s, H2/5)	122,9 (His-C5),	
7,48 (1H, s, His-H5)	125,0 (C6),	
8,82 (1H, s, His-H2)	126,3 (C1),	
	128,9 (His-C4),	
	136,4 (His-C2),	
	144,2 (C3/4),	
	147,1 (C3/4),	
	163,2 (His-CO)	
Estrutura 		
1,78 (3H, s, COCH ₃)	22,1 (COCH ₃)	349 [MH] ⁺
2,46 (2H, t, J= 6,7 Hz, H7)	26,0 (His-Cβ)	
3,09 (2H, t, J= 6,6 Hz, H8)	29,7 (C7)	
3,34 (2H, d, J= 6,5 Hz, His-Hβ)	40,1 (C8)	
4,10 (1H, t, J= 6,6 Hz, His-Hα)	55,4 (His-Cα)	
6,84 (2H, s, H2/5)	114,8 (C5)	HRMS-ESI (calc.) obtido C ₁₆ H ₂₁ N ₄ O ₅ [MH] ⁺ (349,1512) 349,1506
6,85 (2H, s, H2/5)	117,6 (C2)	
7,48 (1H, s, His-H5)	123,1 (His-C5)	
8,81 (1H, s, His-H2)	126,4 (C6)	
	127,5 (C1)	
	128,5 (His-C4)	
	136,5 (His-C2)	
	143,6 (C3/4)	
	146,7 (C3/4)	
	163,2 (His-CO)	
	174,3 (COCH ₃)	
Estrutura 		

Nas reacções de oxidação enzimática das CA com os nucleófilos de enxofre não se verificaram reacções de re-oxidação dos aductos, uma vez que estes nucleófilos inibiam a

enzima, possivelmente por ligação covalente a aminoácidos na proximidade do centro activo.³⁴ No entanto, o mesmo não se aplica aos nucleófilos de azoto. De modo a evitar reacções de re-oxidação dos aductos, realizou-se após a oxidação da NADA a remoção da enzima. Assim sendo, para a remoção da enzima utilizou-se uma coluna *HitrapiTM desalting* (GE Healthcare®) que se eluiu com água. A enzima foi removida nas primeiras fracções e de seguida recolheu-se a *o*-quinona. A presença de enzima (λ_{max} 280 nm) e *o*-quinona (λ_{max} ca. 400 nm) em cada fracção, foi ainda confirmada no UV/Vis. A enzima recuperada em diversas reacções, foi combinada e sujeita a diálise em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM), durante a noite. No final concentrou-se a solução e mediu-se a absorvância, o que permitiu determinar pela lei de Lambert-Beer ($A=\epsilon c l$) a quantidade de enzima recuperada. Para tal, foi necessário determinar o coeficiente de extinção molar da enzima (ϵ $2,4 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Através do kit do BCA (ácido bichiconínico) foi possível realizar a quantificação da enzima e estabelecer a concentração da proteína, necessária para determinar o coeficiente de extinção molar da enzima. O método foi desenvolvido por Smith *et. al.*¹²¹ no entanto, o protocolo utilizado foi o descrito no kit do BCA da Sigma. Assim sendo, após conhecermos a quantidade de enzima recuperada foi possível estabelecer o rendimento do processo de recuperação da enzima, ca. de 30 %. Verificou-se ainda que 100 % da enzima recuperada continuava activa.

Foram ainda investigados outros nucleófilos de azoto, como é o caso do triptofano (Trp) (Tabela II.15) e do valinato de etilo (Val). No entanto, os resultados não foram muito satisfatórios uma vez que, no caso das reacções com a Val não foi isolado nenhum aducto e nas reacções com Trp seria necessário obter maior quantidade de produto para uma identificação inequívoca.

Tabela II.15 – Reacções da NADA com o triptofano.

CA	Ox. (eq.)	Nuc. (eq.)	MS (ESI) <i>m/z</i>
NADA	NaIO ₄ (1,0)	Trp (5)	-
NADA	Ty	Trp (5)	436 [M + K] ⁺
NADA	Sal de Frémy (1,0)	Trp (5)	398 [MH] ⁺

No ensaio com o Trp, usando *mushroom tyrosinase* como oxidante, identificou-se por ESI-MS, o ião a *m/z* de 436, compatível com o possível aducto [M + K]⁺, e usando Sal de Frémy atribuiu-se o ião a *m/z* 398, ao aducto protonado. Estes resultados sugerem que pode ter corrido reacções de adição nucleófila com estes a.a. Outro nucleófilo investigado foi a serina, um nucleófilo de oxigénio, no entanto nenhum aducto foi identificado.

II.4.2 Preparação e caracterização de derivados de azoto da MeDA e diMeDA

Para a preparação de derivados conjugados da diMeDA (**37**) e MeDA (**38**), com nucleófilo de azoto usou-se a NAcHis, uma vez que os aductos poderiam ser utilizados como padrões em estudos com proteínas. Numa primeira aproximação tentou-se a oxidação com NaIO_4 segundo a metodologia descrita anteriormente para a NADA; no entanto, nenhum aducto foi isolado. Fazendo uma analogia com as reacções da DA e NADA com a NAcHis, onde só no caso da NADA (devido à protecção do grupo amina) foi possível o isolamento e a caracterização de aductos, foi necessário proceder à protecção da amina da diMeDA (**37**) e da MeDA (**38**), segundo a metodologia utilizada para a acetilação da NADA. Os compostos obtidos foram caracterizados por ^1H e ^{13}C -RMN, e por espectrometria de massa (ESI e HRMS-ESI). O produto da acetilação da MeDA (**38**), foi confirmado no espectro de protão, com a atribuição do singlete a 1,77 ppm, aos protões metilo do grupo acetilo. No espectro de carbono os sinais a 21,8 ppm, referente ao carbono do grupo metilo do acetilo (COCH_3), e a 172,9 ppm, atribuído ao carbonilo, confirmam uma vez mais a formação do composto *N*-acetil-metildopamina (**89**, Ac-MeDA). Já na acetilação da diMeDA (**37**), o espectro de protão do produto isolado apresentou um padrão mais complexo. Verificou-se que, além da acetilação da amina, cujos sinais do grupo metilo do acetilo surgem como singletos a 1,60 ppm e 1,82 ppm, o que evidencia carácter diastereotópico, também tinha ocorrido acetilação nos grupos álcool do anel, devido ao singlete a 2,22 ppm que integra para doze protões. Os sinais no espectro de carbono também confirmaram a ocorrência de acetilação nos grupos hidroxilo (19,9 ppm, O-COCH_3). No entanto, para realizar a reacção com o nucleófilo NAcHis, foi necessária a hidrólise selectiva dos grupos acetilo do anel aromático, realizada sob condições suaves, (à t.a.), de modo, a não remover o grupo acetilo da amina. Deste modo, foi obtido o composto *N*-acetil-*N*, α -dimetildopamina, (**90**, Ac-di-MeDA), cujo espectro de protão e carbono confirmam a existência de um único grupo acetilo.

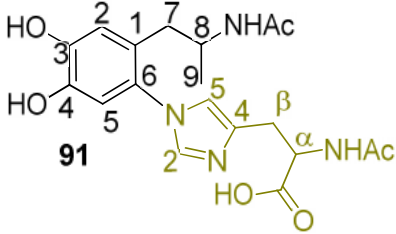
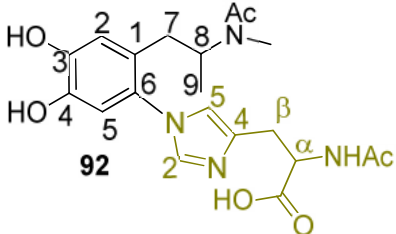
Partindo dos compostos Ac-MeDA (**89**) e Ac-di-MeDA (**90**), e segundo a metodologia anteriormente descrita para a NADA, usando como oxidante NaIO_4 , foram isolados como compostos maioritários das reacções os respectivos aductos na posição 6 do anel aromático, 6-(*N*-acetil-histidin-*N*1'-il)-*N*-acetil- α -metildopamina (**91**, 6-NAcHis-Ac-MeDA) e 6-(*N*-acetil-histidin-*N*1'-il)-*N*-acetil-*N*, α -dimetildopamina (**92**, 6-NAcHis-Ac-diMeDA), (Tabela II.16), segundo a literatura por nós consultada, aqui apresentados pela primeira vez.

Tabela II.16 - Produtos da reacção entre as CA, Ac-MeDA (**89**) e Ac-diMeDA (**90**) com a NAcHis.

CA	Ox./Nuc.	Produtos identificados	η (%)
Ac-MeDA	$\text{NaIO}_4/\text{NAcH}$ (5 eq.)	6-NAcHis-Ac-MeDA (91)	5
Ac-diMeDA	$\text{NaIO}_4/\text{NAcH}$ (10 eq.)	6-NAcHis-Ac-diMeDA (92)	8

Os aductos 6-NAcHis-Ac-MeDA (**91**) e 6-NAcHis-Ac-diMeDA (**92**), foram caracterizados por ^1H -RMN e ESI-MS, e os dados espectroscópicos estão apresentados na Tabela II.17. A atribuição dos sinais no espectro de próton dos compostos **91** e **92**, foi realizada por comparação com o espectro de próton do aducto 6-NAcHis-NADA (**25**). De referir que o sinal a 6,87/6,82 ppm que surge como um singlete confirma a adição à posição 6 do anel aromático. O próton H_α da NAcHis não foi identificado, muito provavelmente porque, à semelhança do espectro de próton do composto **25**, encontra-se na zona de irradiação do sinal da água.

Tabela II.17 - Dados espectroscópicos dos aductos 6-NAcHis-Ac-MeDA (**91**) e 6-NAcHis-Ac-diMeDA (**92**).

Estrutura	^1H -RMN (D_2O)	MS (ESI)
	δ (ppm)	m/z
 <p>91</p>	0,99 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H9)	405 $[\text{MH}]^+$
	1,81 (3H, s, COCH_3)	
	1,99 (3H, s, NAcHis- COCH_3)	
	2,84 (2H, s, H7)	
	2,99 (2H, s, NAcHis- H_β)	
	3,33 (1H, m, H8)	
	6,87 (2H, s, H2/5)	
	7,43 (1H, s, NAcHis-H5)	
	7,91 (1H, s, NAcHis-H5')	
	8,80 (1H, s, NAcHis-H2)	
 <p>92</p>	0,99-1,02 (3H, m, H9)	419 $[\text{MH}]^+$
	1,15 (3H, m, H9')	
	1,89 (3H, s, COCH_3)	
	1,97 (3H, s, NAcHis- COCH_3)	
	2,18 (2H, s, H7)	
	2,52 (2H, s, NAcHis- H_β)	
	2,75 (1H, s, N- CH_3)	
	3,30 (1H, m, H8)	
	6,82 (2H, s, H2/5)	
	7,46 (1H, s, NAcHis-H5)	
	8,74 (1H, s, NAcHis-H2)	

II.4.3 Em Resumo:

- ✚ A preparação de derivados de azoto da NADA envolveu a oxidação química (NaIO_4 , Sal de Frémy e Ag_2O) ou enzimática (*tyrosinase*) da CA, com subsequente adição do nucleófilo (NACHis e Imid). Foi isolado como composto maioritário das reacções o mono-aducto em 6; no entanto, na oxidação com *tyrosinase* foi também isolado o aducto em 2.
- ✚ Estão aqui apresentados pela primeira vez os compostos, 6-NACHis-Ac-MeDA (**91**) e 6-NACHis-Ac-diMeDA (**92**), sintetizados por oxidação com NaIO_4 das respectivas CA.
- ✚ Independentemente do oxidante utilizado, os rendimentos das reacções foram baixos, entre 2 e 18 %.
- ✚ Da hidrólise ácida dos aductos 6-NACHis-NADA (**25**) e 6-Imid-NADA (**29**), foram obtidos os compostos 6-His-DA (**87**), 6-His-NADA (**88**) e 6-Imid-DA (**86**).

II.5 Estudos de RMN e espectrofotométricos das CA-quinonas

O estudo da estabilidade das quinonas da DA (**1**), NADA (**20**) e DA-Cbz (**60**), envolveu duas aproximações, estudos de ^1H -RMN e espectrofotométricos. Na investigação de RMN, foram utilizados dois oxidantes, um químico (NaIO_4) e um enzimático (*mushroom tyrosinase*), e nalguns ensaios foi adicionado à mistura reaccional GSH ou NACHis (Tabela II.18).

Nos espectros de protão a formação das respectivas *o*-quinonas foi observada pela mudança instantânea na ressonância dos protões aromáticos, de ~6,5-6,8 ppm para ~6,2-7,2 ppm,¹¹⁸ como podemos observar, na Figura II.13, referente à oxidação da DA com NaIO_4 (2 eq.). Os protões da quinona, H5 e H6, surgem a 7,09 ppm como um duplete, com constante de acoplamento de 10,0 Hz (típica de *o*-quinonas),¹²² ou a 6,43 ppm, como um duplete, ($J = 10,1$ Hz). O protão H2 aparece como um singleto a 6,39 ppm (Figura II.13b).

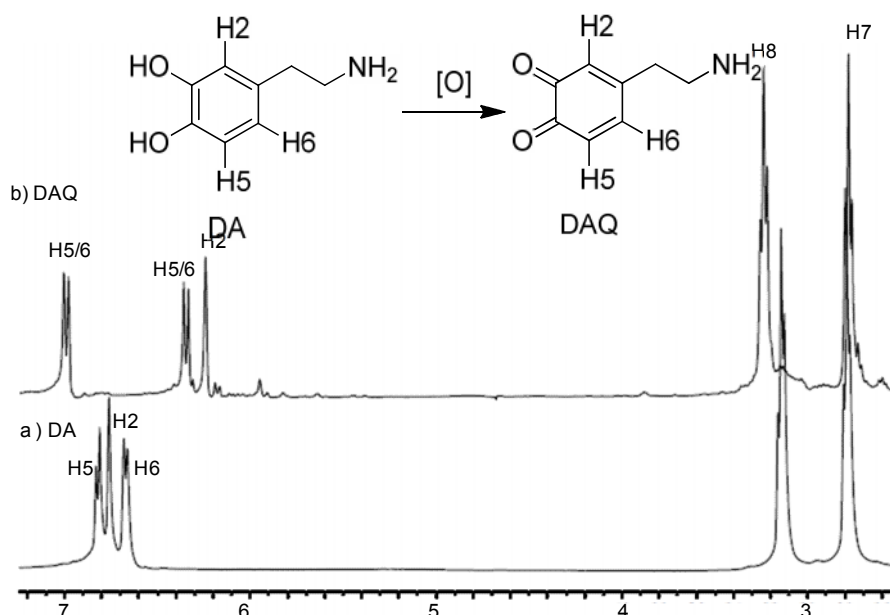


Figura II.13 - Espectros de ^1H -RMN da DA (a) e da DAQ (b), gerada com 2 eq. de NaIO_4 .

Tabela II.18 - Estudos de ^1H -RMN das respectivas quinonas da DA, NADA e DA-Cbz.

CA	Ox.	Nuc.	Solv.
DA	NaIO_4 (1 e 2 eq.)	-	D_2O
DA-Cbz	NaIO_4 (1 e 2 eq.)	-	D_2O
NADA	NaIO_4 (1 eq.)	-	D_2O
DA	<i>tyrosinase</i>	-	tampão fosfato deuterado (pH 7,4; 50 mM)
DA	<i>tyrosinase</i>	GSH	tampão fosfato deuterado (pH 7,4; 50 mM)
NADA	<i>tyrosinase</i>	-	tampão fosfato deuterado (pH 7,4; 50 mM)
NADA	NaIO_4 (1 eq.)	NACHis	D_2O

Nos ensaios com DA na presença de NaIO_4 verificou-se que para a conversão total da DA à respectiva *orto*-quinona, são necessários 2. eq. de oxidante (Figura II.13), uma vez que, com 1 eq. foi observado no espectro de próton DA por reagir. Relativamente à mesma experiência mas usando NADA e DA-Cbz, verificou-se que 1 eq. de NaIO_4 foi suficiente para a conversão total às respectivas *o*-quinonas. A necessidade da utilização de excesso de periodato aquando a oxidação da DA, deve-se possivelmente à presença de DA sob a forma de hidrocloreto (DA.HCl). Quanto à oxidação da DA e NADA realizada na presença de *mushroom tyrosinase* (Tabela II.18), assim que se adicionou a enzima, verificou-se uma mudança de cor para vermelho ou amarelo, respectivamente, característica da formação da respectiva *o*-quinona. No entanto, no espectro de próton, os sinais típicos das *o*-quinonas não aparecerem, mantendo-se o espectro idêntico ao do material de partida (Figura II.13a). Efectuou-se um novo ensaio com DA, onde após a adição da enzima e aquisição do espec-

tro de ^1H -RMN, juntou-se GSH (5 eq.). De imediato verificou-se uma alteração de cor para amarelo, e realizou-se um novo espectro, onde se observou uma alteração no padrão da zona aromática. Continuou-se a monitorização com a realização de mais dois espectros, com 30 min e 60 min de reacção. No final a mistura reaccional foi purificada por HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-FCT-1, e o produto 5-GSH-DA (**11**) foi isolado, confirmando a formação da DAQ. O facto de não haver alteração no espectro de protão após a adição da *tyrosinase*, não é de todo clara, uma explicação pode estar relacionada com a formação da DAQ através da ligação ao centro activo da enzima. A DAQ pode associar-se fortemente ao centro activo da *tyrosinase*, com um tempo de residência na proteína mais longo do que a escala de tempo de medição por RMN.^{123, 124} Bisaglia *et al.*, justificam a DAQ não ser visível no espectro de RMN devido à baixa concentração e à sua natureza transiente.¹²⁵

Em paralelo, foram realizados estudos espectrofotométricos de monitorização da formação da DAQ após a adição da *tyrosinase*. Contudo, devido à rapidez das reacções de ciclição intramolecular, a DAQ com absorvância de 390 nm não foi detectada, mas sim o aminocromo (**13**) com λ_{max} de 475 nm.^{19, 27, 125}

No ensaio onde se adicionou NAcHis (10 eq.) à NADA-quinona gerada com NaIO_4 (1 eq.), (Tabela II.18), foi possível identificar os sinais do aducto 6-NacHis-NADA (**25**) Figura II.14, logo após a adição do nucleófilo. Foi ainda realizado um novo espectro passado 15 h, onde se verificou novamente os sinais referentes ao aducto.

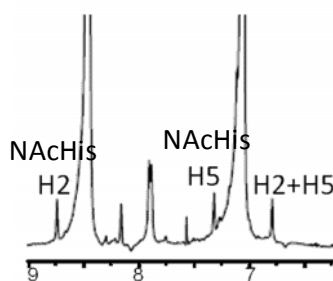
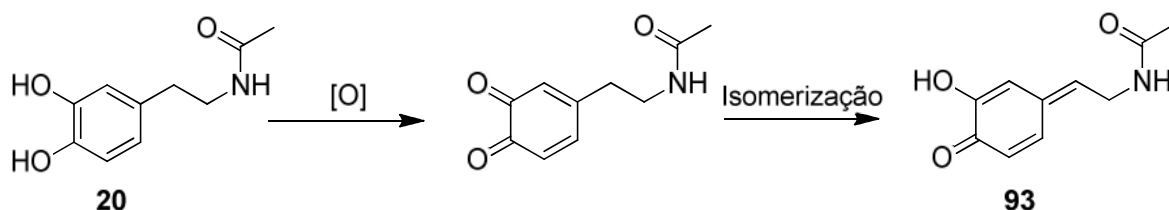


Figura II.14 - Espectro de protão obtido após a adição de NAcHis (10 eq.) à NADA-quinona, gerada com NaIO_4 (1 eq.).

Borovansky *et al.*, realizaram estudos espectrofotométricos com a NADA, onde investigaram a estabilidade da *o*-quinona e respectiva isomerização à *para*-quinonametileno (**93**), que serviram de ponto de partida à nossa investigação.¹¹⁹ Deste modo, realizou-se a oxidação da NADA, com uma concentração de 0,47 e 1,39 μM com *mushroom tyrosinase* 62,3 e 187 U, respectivamente, em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM). O desenvolvimento da reacção monitorizou-se espectrofotométricamente, pela aquisição de espectros com intervalos de tempo de 1 min, durante 1 h, Figura II.15a e Figura II.16a.



Esquema II.9 - Oxidação da NADA à respectiva *o*-quinona e isomerização à *para*-quinonametileno.

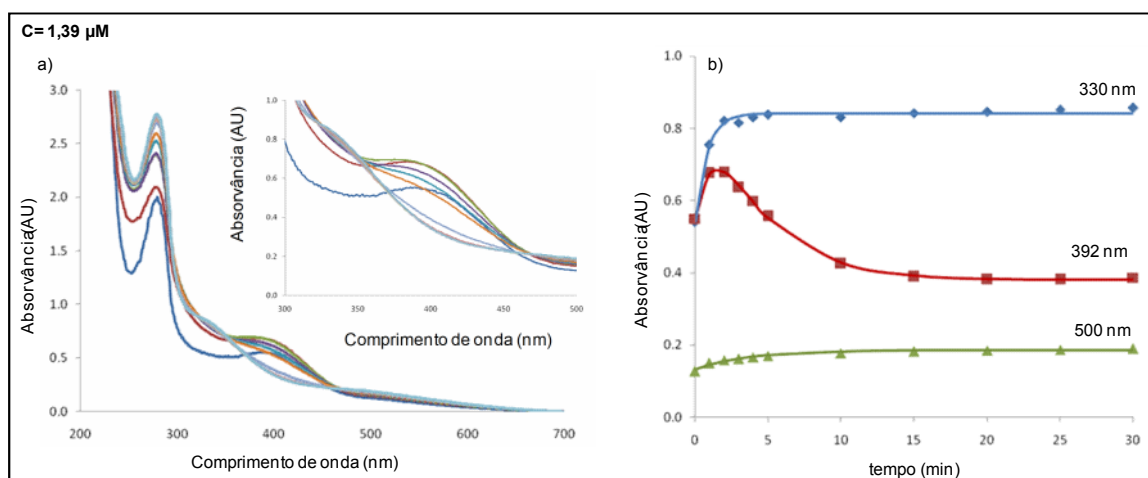


Figura II.15 - Oxidação da NADA (1,39 μM) com *tyrosinase*. a) Espectros de UV/Vis obtidos com um intervalo de 1 min. b) Dependência da absorvância a 300, 392 e 500 nm como tempo.

A formação de *o*-quinona foi de imediato observada a ca. 400 nm (Figura II.15a e Figura II.16a), no entanto, com a diminuição progressiva da *o*-quinona observa-se a formação da *para*-quinonametileno, caracterizada pelo aumento da absorvância a 500 nm. A mesma análise pode ser efectuada através dos gráficos b das Figura II.15 e Figura II.16, a 392 e 500 nm.

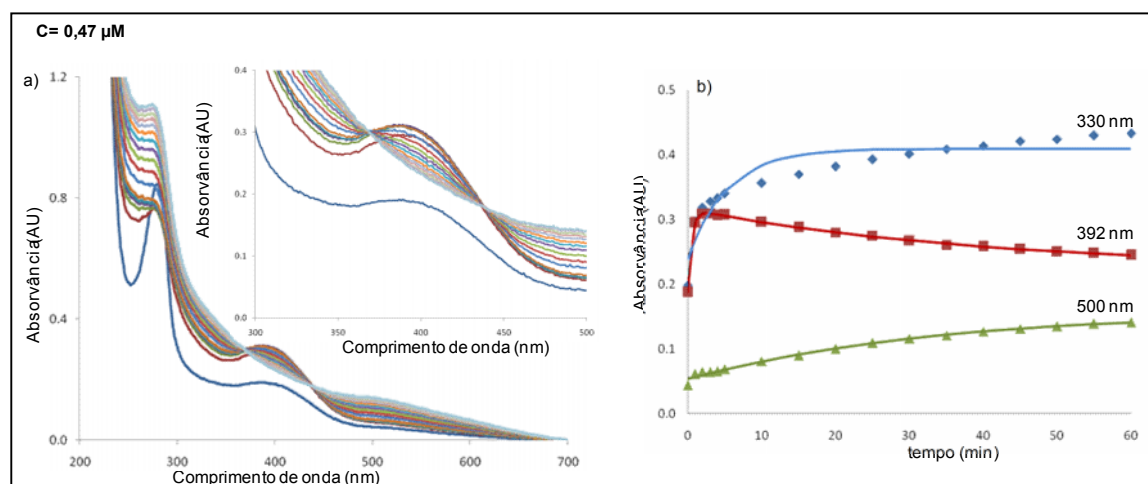


Figura II.16 - Oxidação da NADA (0,47 μM) com *tyrosinase*. a) Espectros de UV/Vis obtidos com um intervalo de 1 min. b) Dependência da absorvância a 300, 392 e 500 nm como tempo.

Observa-se que tanto a velocidade conversão da NADA em *o*-quinona, como a conversão de *o*-quinona em *para*-quinonametileno depende da concentração, sendo tanto mais rápidas quanto maior a concentração (1,39 μ M). Observa-se que com a NADA não ocorrem reacções de ciclização intramolecular, mas sim de isomerização (Esquema II.9).

Os estudos espectrofotométricos da oxidação enzimática da DA e da NADA com *mushroom tyrosinase*, mostraram que as quinonas são espécies instáveis, que rapidamente sofrem reacções de ciclização intramolecular ou de isomerização, respectivamente. No entanto, revelam que a quinona da NADA apresenta uma maior estabilidade. Não é possível comparar os resultados dos estudos espectrofotométricos com os de RMN, uma vez, que neste caso a *o*-quinona não foi observada.

II.5.1 Em Resumo:

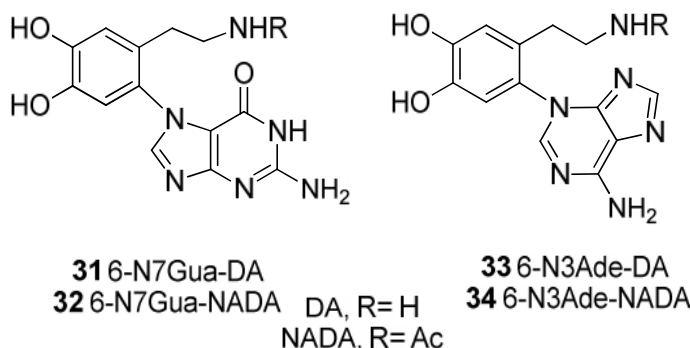
- Utilizando NaIO_4 como oxidante, foi possível caracterizar por ^1H -RMN as respectivas *o*-quinonas da DA, NADA e DA-Cbz, com base na ressonância dos prótons aromáticos a ~6,2-7,2 ppm. O mesmo não se verificou quando a *tyrosinase* foi utilizada como oxidante, possivelmente devido à forte associação da DAQ ao centro activo da enzima. O tempo de residência da DAQ na proteína deve ser mais longo do que a escala de tempo de medição por RMN.
- Os estudos espectrofotométricos de oxidação enzimática da DA e da NADA com *tyrosinase*, mostraram que as quinonas são espécies muito instáveis que sofrem reacções de ciclização intramolecular ou de isomerização, respectivamente. Revelaram ainda uma maior estabilidade por parte da NADA-quinona.

II.6 Reacções da DA e NADA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenina e com o DNA

As reacções da DA e NADA com os bionucleófilos dG e dA, revelaram-se um desafio, porque as tentativas para reproduzir as condições experimentais descritas na literatura por Cavalieri *et al.*, Tabela II.19 e Figura II.17, foram infrutíferas.²⁰ Recentemente, os autores voltaram a estudar a reacção da NADA com a dG, e observaram por ESI a formação do composto 6-N7dG-NADA (**94**) precursor do aducto 6-N7Gua-NADA (**32**).⁴¹

Tabela II.19 – Reacções da DA e NADA com dG e Ade, aductos obtidos e rendimentos.²⁰

Aductos	Rendimento (η %)	Rendimento (η %)
	NaIO ₄ (0,5 eq.)	Ag ₂ O (8,3 eq.)
6-N7Gua-DA (31)	46	-
6-N3-Ade-DA (33)	40	-
6-N7Gua-NADA (32)	58	60
6-N3-Ade-NADA (34)	51	-

**Figura II.17** – Estrutura dos aductos 6-N7Gua-DA(NADA) e 6-N3-Ade-DA(NADA).

Além da metodologia realizada pelos autores,²⁰ que envolveu a oxidação química com NaIO₄ ou Ag₂O, da DA e da NADA à respectiva quinona, seguida da adição do nucleófilo, outras metodologias foram realizadas, (cf. secção III.10 pág. 180). No entanto, como referido anteriormente foi impossível reproduzir os resultados obtidos por Cavalieri *et al.*, pelo que, os resultados obtidos por estes autores são encarados com bastante reserva. Além disso, qualquer tentativa para obter aductos nestas reacções revelou-se infrutífera. Estes resultados não são de todo surpreendentes, dado a dificuldade observada em obter aductos de azoto com a NADA, isolados apenas para a NAcHis e Imid.

Cavalieri *et al.*, também investigaram as reacções da DA com o DNA, utilizando *mush-room tyrosinase* como oxidante, e isolaram os aductos despurinantes da dG e da dA, N-7Gua (**31**) e N-3Ade (**33**), respectivamente, obtidos por reacções de adição de Michael 1,4.²⁰ Recentemente, Cavalieri *et al.*, estudaram, a reacção da NADA com o DNA, usando uma vez mais *tyrosinase*, e observaram por ESI os aductos despurinantes 6-N7Gua-NADA (**32**) e 6-N3Ade-NADA (**34**).⁴¹ No entanto, nesta última publicação nada é referido sobre o rendimento destas reacções, o que leva a considerar com bastante reserva os bons rendimentos apresentados na primeira vez.²⁰

Investigou-se as reacções da NADA e da DA com o DNA, Tabela II.20, mas os resultados uma vez mais não foram reprodutíveis com os apresentados por Cavalieri *et al.*.^{20, 41} Contudo, no ensaio com NADA, usando NaIO₄ como oxidante, após hidrólise térmica, foi

possível identificar por ESI um possível aducto protonado da NADA com a Gua, a m/z de 345. No entanto, não foi possível obter o aducto em quantidade suficiente para proceder a uma caracterização estrutural mais completa.

Tabela II.20 - Reacções da DA e NADA com o DNA.

CA	Ox.	Aductos
NADA	ty	- ^{a)}
NADA	ty*	- ^{a)}
NADA	NaIO ₄	m/z 345 - ^{b)}
DA	ty	- ^{a)}

* Remoção da enzima. -^{a)} Nenhum aducto identificado,

-^{b)} Compatível com o aducto protonado da NADA com a Gua, (identificado por ESI).

Verificamos assim que as quinonas da DA e da NADA têm bastante dificuldade em reagir com a dG e o DNA. O significado da formação de produtos destas reacções na iniciação de tumores ou doenças neurodegenerativas afigura-se questionável.^{20, 41}

II.6.1 Em Resumo:

- A reacção das o-quinonas da DA e da NADA com dG e DNA, foi investigada, e nenhum aducto foi isolado em quantidade suficiente para a realização da sua caracterização estrutural total, revelando a dificuldade de reacção entre estas moléculas.
- Nas reacções da NADA com o DNA foi isolado em quantidade vestígal e identificado por ESI, um possível aducto da guanina.
- O significado da formação de aductos das o-quinonas DA e da NADA com dG e DNA que possam estar envolvidos em processos de iniciação de tumores ou outras doenças é encarado com reserva.

II.7 Modificação das proteínas HSA, Hb e Mb e do péptido LQQCPF por CA

II.7.1 Notas prévias:

- Na contagem dos aminoácidos das sequências das proteínas HSA, Hb e hhMb, o programa de pesquisa de base de dados *Expasy*, inclui os aminoácidos que representam a porção pró-peptídica de sinalização, que não são observados na proteína transcrita, traduzida e transportada, mas estão presentes no gene. Na HSA são os 24 primeiros aminoácidos, enquanto na Hb e hhMb é o primeiro, a Met terminal. Tendo em conta que na literatura a sequência pró-peptídica inicial não é considerada na numeração dos resíduos, procedeu-se do mesmo modo no presente trabalho, para possibilitar uma comparação directa.
- Os a.a. podem ser identificados com várias designações, por exemplo pelo nome (cisteína), símbolo (Cys) ou abreviatura (C). De modo, facilitar a leitura ao longo da tese, nos aductos de a.a. será utilizado o símbolo, e nos aductos de péptidos a abreviatura.^{76, 84, 88}
- Para a identificação de fragmentos peptídicos protonados, a nomenclatura clássica utiliza as designações iões a, b e y (Figura II.18). Da quebra de uma ligação peptídica resulta a formação de iões b e y. Num fragmento peptídico de um ião-b a carga é retida na amina terminal, enquanto num fragmento peptídico de um ião-y a carga permanece no carbonilo terminal. Através da perda do grupo carbonilo dos iões b, formam-se os iões a.^{59, 102, 103}

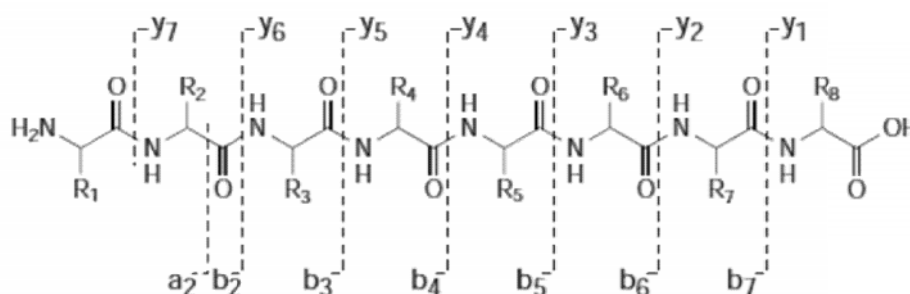


Figura II.18 - Representação esquemática da nomenclatura clássica de fragmentos de iões peptídicos.

Tabela II.21 – Tabela de aminoácidos: nome, símbolo, abreviatura e estrutura.

Nome	Estrutura	Nome	Estrutura	Nome	Estrutura
Glicina Gly G		Treonina Thr T		Triptofano Trp W	
Alanina Ala A		Asparagina Asn N		Serina Ser S	
Leucina Leu L		Glutamina Gln Q		Arginina Arg R	
Isoleucina Iso I		Tirosina Tyr Y		Histidina His H	
Metionina Met M		Cisteína Cys C		Ácido aspártico Asp D	
Prolina Pro P		Lisina Lys K		Ácido glutâmico Glu E	
Valina VAL V		Fenilalanina Phe F			

II.7.2 Introdução geral

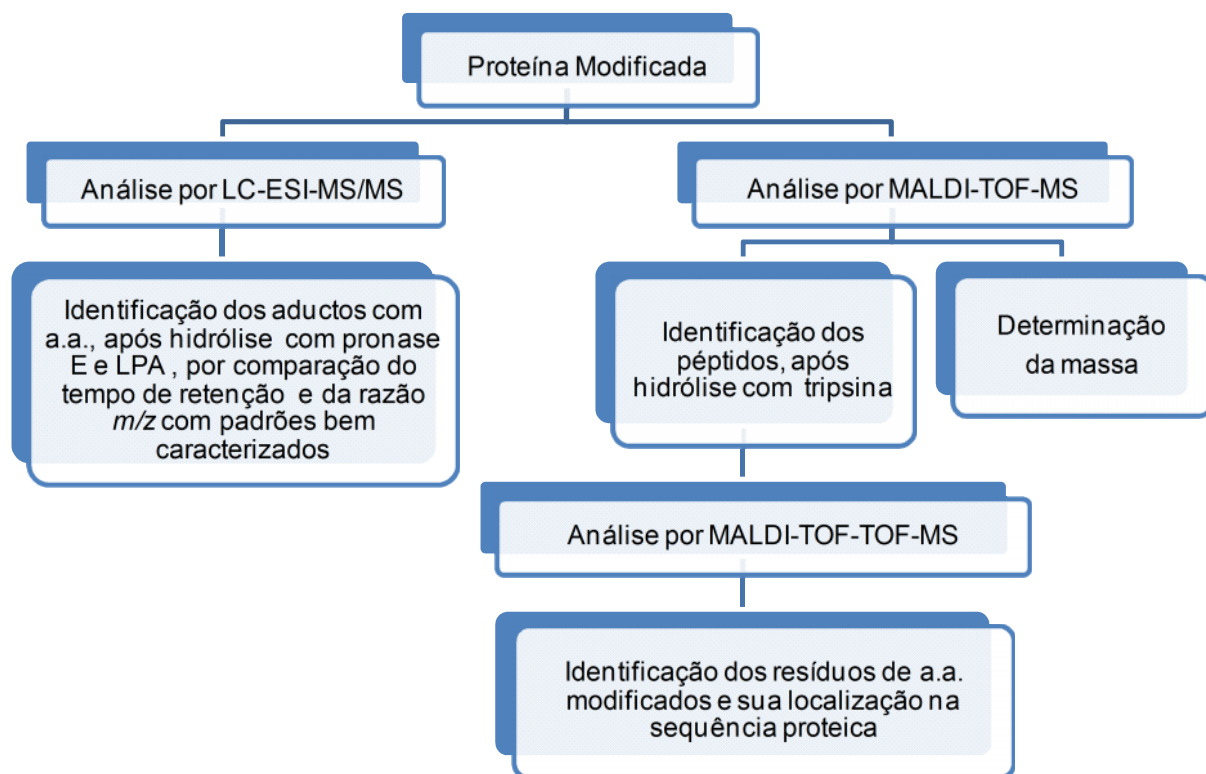
Da investigação das reacções das catecolaminas DA (**1**), NADA (**20**), MeDA (**38**) e diMeDA (**37**) com os diversos a.a., foi possível verificar a reactividade das quinonas, caracterizar os aductos formados e a regioselectividade da modificação. Além disso, os aductos de a.a. podem ser utilizados como padrões, em reacções de modificação de biomacromoléculas *in vivo* ou *in vitro*, assim como, na identificação dos aductos formados.

Foi investigada a modificação covalente das proteínas HSA, Hb e hhMb e do péptido LQQCPF, por incubação com as quinonas da DA (**1**), NADA (**20**), MeDA (**38**) e diMeDA (**37**). Nesse sentido, monitorizou-se a extensão da modificação na HSA e na Hb, em função da concentração de NADA quinona. Utilizaram-se dois oxidantes para formar as quinonas, um químico (NaIO_4) e um enzimático (*mushroom tyrosinase*), o que permitiu relacionar a extensão da modificação nas proteínas com o oxidante.

A estimativa do grau de modificação de uma proteína/péptido, foi realizada por análise dos espectros de MALDI-TOF-MS, por subtracção da massa da proteína/péptido nativa e modificada (Esquema II.10).

Para identificação dos resíduos modificados nas proteínas foram utilizadas duas abordagens. Numa realizou-se a hidrólise enzimática das proteínas modificadas aos a.a. com pro-nase E e LAP, e os aductos foram identificados por LC-ESI-MS/MS. Para isso, foram utilizados padrões previamente sintetizados no nosso laboratório e bem caracterizados. A comparação do tempo de retenção e da razão m/z , dos padrões com o dos aductos de proteínas, foi determinante para identificar os resíduos de a.a. modificados e a regioselectividade da modificação (Esquema II.10).

Noutra abordagem, realizou-se a digestão enzimática das proteínas modificadas a péptidos utilizando a tripsina, seguida de análise por MALDI-TOF-MS. Os fragmentos peptídicos foram identificados segundo a sua razão m/z , por comparação com valores teóricos de massa dos péptidos da proteína em estudo, originados por digestões *in silico*, no programa *ExPASy*¹⁰⁸. Foi realizada por MALDI-TOF-TOF-MS, a fragmentação dos péptidos, com incremento de massa consistente com a modificação pela CA, e assim, especificou-se a localização exacta do resíduo modificado na sequência do péptido (Esquema II.10).



Esquema II.10 - Resumo da aproximação realizada para identificação dos resíduos modificados nas proteínas/péptido.

Os aductos resultantes da modificação do péptido modelo foram identificados por técnicas de MS e de RMN. Deste modo, obteve-se informação adicional, quanto ao resíduo modificado na sequência proteica.

A reprodutibilidade das análises realizadas, para identificação dos resíduos modificados nas proteínas, pelas várias técnicas de espectrometria de massa, foi assegurada. Para isso, as reacções foram repetidas e realizadas novas análises cujos resultados se revelaram reprodutíveis.

II.7.3 Reacção de CA com o péptido LQQCPF

II.7.3.1 Estudos prévios

Foi investigado o péptido modelo da HSA, LQQCPF, que contém o resíduo mais nucleófilo da proteína, a Cys34.⁶³ O péptido foi caracterizado por ¹H-RMN (Figura II.19), ¹³C-RMN, HSQC (Figura II.20) e por ESI-MS. Os dados espectroscópicos (Tabela II.22), constituem pontos de partida para a caracterização dos aductos peptídicos das CA. Foi ainda determinado o tempo de retenção do péptido, $t_R = 13,2$ min, no HPLC semi-preparativo utili-

zando o programa HPLC-IST-1, que permitiu monitorizar as reacções de modificação com as CA e respectivas purificações.

A atribuição dos sinais do péptido LQQCPF nos espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (Tabela II.22), foi sustentada pela análise dos resultados obtidos na experiência bidimensional de HSQC (Figura II.20). Através da análise do espectro de ^1H -RMN, atribuiu-se os sinais com desvios químicos característicos. Assim sendo, foram atribuídos os prótons do grupo metilo terminal do *iso*-butilo da leucina (Leu), que se apresentam como multipletos a 0,84-0,86 ppm e o H_γ integrado no multipletos a 1,53-1,99 ppm. Os prótons H_β da Cys, surgem como multipletos a 2,74-2,76 ppm e o H_α aparece como triplo a 4,23 ppm; os prótons H_β e H_γ da glutamina (Gln) surgem no multipletos a 1,53-1,99 ppm e a 2,24-2,27 ppm, respectivamente. Foram ainda atribuídos os prótons H_β da fenilalanina (Phe), que surgem como duplo duplo a 3,01 e a 3,11 ppm e os prótons do anel aromático, que aparecem como multipletos a 7,18-7,30 ppm. Os respectivos carbonos foram atribuídos por correlação dos sinais de cada próton no HSQC e os valores obtidos apresentaram-se, dentro dos valores esperados.

No espectro de carbono o sinal a 60,6 ppm foi atribuído ao C_α , da prolina (Pro), pois trata-se de um sinal típico deste monómero. No espectro de HSQC a correlação deste carbono, permitiu a atribuição do H_α no espectro de ^1H -RMN, como multipletos a 4,27-4,32 ppm. Ainda no espectro de HSQC a correlação entre o sinal de cada C_α da Gln a 53,7 e a 53,9 ppm permitiu a identificação dos respectivos prótons a ca. 4,70 ppm, não detectados directamente no espectro de próton, por se encontrarem na zona de irradiação do sinal da água. No espectro de ^1H -RMN, faltava atribuir na região característica dos CH_α , os sinais do multipletos a 4,27-4,32 ppm e do triplo a 3,93 ppm (Figura II.19), e os prótons H_α da Phe e da Leu. Atribuiu-se o sinal a 4,27-4,32 ppm ao H_α da Phe, uma vez que este próton é ligeiramente mais desblindado que o H_α da Leu devido à vizinhança do anel aromático. Os prótons metilénicos H_β e H_γ da Pro e H_β da Leu surgem integrados no multipletos a 1,53-1,99 ppm. Com os dados espectroscópicos que temos não conseguimos distinguir inequivocamente os prótons H_β e H_γ da Pro; seria necessário um HMBC, mas infelizmente não foi possível adquirir um espectro deste tipo com boa qualidade. Ao analisarmos o HSQC para a atribuição dos respectivos carbonos, observou-se na correlação entre o sinal a 1,75 ppm e o respectivo carbono, uma correlação adicional para um próton a 2,08-2,12 ppm, o que evidencia carácter diastereotópico num destes grupos metileno. Os prótons metilénicos H_δ da Pro aparecem como multipletos 3,63-3,67 ppm. Estes prótons surgem tipicamente a um campo mais baixo que a maioria dos prótons deste tipo, pois encontram-se adjacentes a um azoto e muito próximo de um grupo carbonilo. O carbono C_α da Pro, foi atribuído a 48,1 ppm através da análise do HSQC.

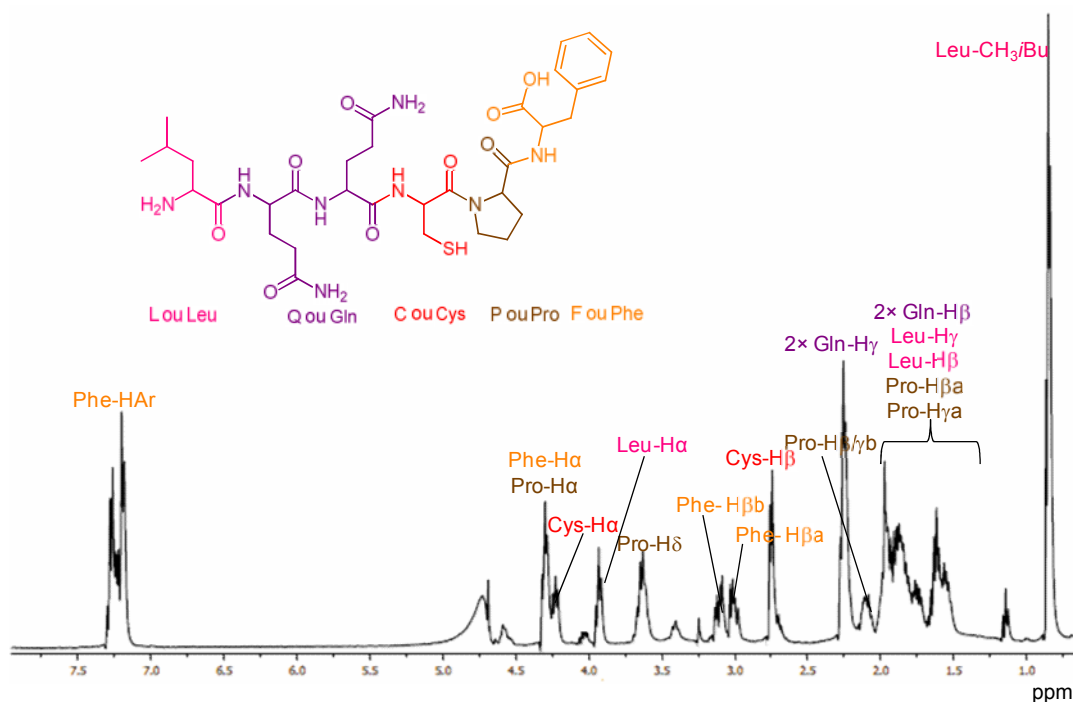


Figura II.19 - Espectro de ^1H -RMN do péptido LQQCPF.

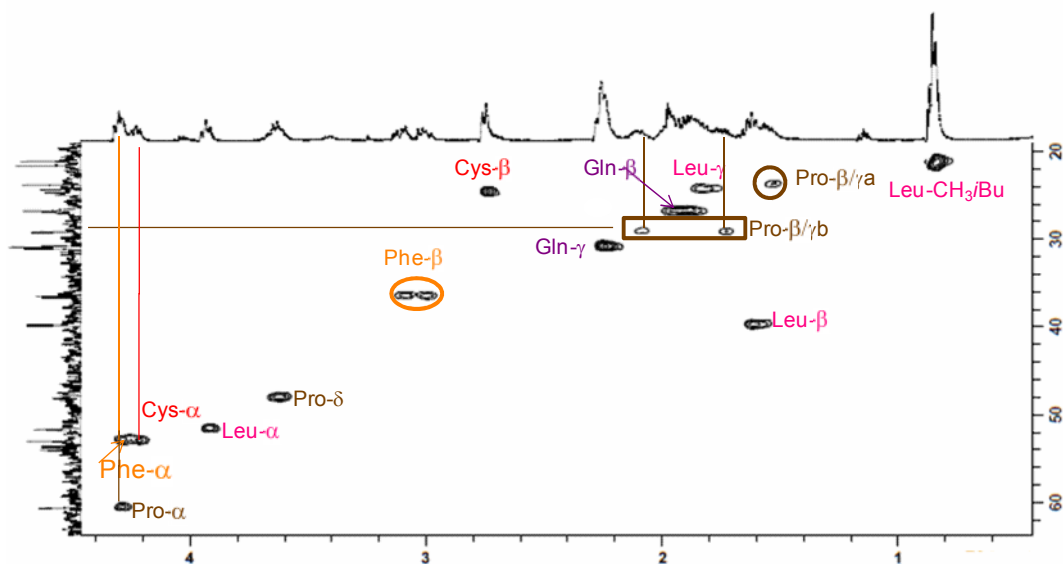


Figura II.20- Espectro de HSQC do péptido LQQCPF.

Tabela II.22 - Dados espectroscópicos obtidos para o péptido LQQCPF.

¹ H-RMN (D ₂ O) δ (ppm)	¹³ C-RMN (D ₂ O) δ (ppm)	MS (ESI) m/z
	21,1; 21,6 (2×Leu-C _{H3} /Bu)	
	23,8 (Pro-C _β /γ)	
0,84-0,86 (6H, m, Leu-CH ₃ /Bu)	24,3 (Leu-C _γ)	
1,53-1,99 (10H, m, 2× Gln-H _β + Leu-H _γ + Leu-H _β + Pro-H _{βa} + Pro-H _{γa})	24,7 (Cys-C _β)	
	26,8 (2×Gln-C _β)	
2,08-2,12 (1H, m, Pro-H _β /γb)	29,2 (Pro-C _β /γ)	
2,24-2,27 (4H, m, 2× Gln-H _γ)	30,9; 31,0 (2×Gln-C _γ)	
2,74-2,76 (2H, m, Cys-H _β)	36,5 (Phe-C _β)	
3,01 (1H, dd, J= 14,0 Hz e J= 8,4 Hz, Phe-H _{βa})	39,8 (Leu-C _β)	757
3,11 (1H, dd, J= 14,0 Hz e J= 5,8 Hz, Phe-H _{βb})	48,1 (Pro-C _δ)	[M + Na] ⁺
	51,7 (Leu-C _α)	735 [MH] ⁺
3,63-3,67 (2H, m, Pro-H _δ)	52,9 (Phe-C _α)	
3,93 (1H, t, J= 7,1 Hz, Leu-H _α)	53,0 (Cys-C _α)	
4,23 (1H, t, J= 7,2 Hz, Cys-H _α)	53,7; 53,9 (2×Gln-C _α)	
4,27-4,32 (2H, m, Pro-H _α + Phe-H _α),	60,6 (Pro-C _α)	
ca. 4,70 (Gln-H _α)	127,2 (Phe-C _{Ar4})	
7,18-7,30 (5H, m, Phe-H _{Ar})	128,7; 129,3 (Phe-C _{Ar2,6/3,5})	
	136,5 (Phe-C _{Ar1})	
	166,4 (CO)	
	170,2; 170,4 (2×Gln-CO)	
	172,5; 173,5; 174,8 (3×CO),	
	177,7 (2x amidaCO)	

II.7.3.2 Reacções de modificação de CA

Foi investigada a reacção das catecolamina-quinonas da DA (**1**), NADA (**20**), MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), na presença do péptido LQQCPF da HSA. Nesse sentido, as CA foram oxidadas, com *mushroom tyrosinase*, de forma a gerar a respectiva o-quinona e 2 eq. do péptido modelo foram adicionados. As reacções permaneceram sob agitação à t.a. durante 3 h. Os produtos foram isolados por HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-IST-1 e analisados por MALDI-TOF-MS, ESI-MS e RMN.

A análise do péptido modificado pelas CA quinonas, envolveu a utilização da metodologia descrita na análise do péptido não modificado. Sendo assim, na presente secção são apenas pormenorizadas as observações relevantes para a caracterização do resíduo modificado.

Da reacção de modificação da NADA-quinona com o péptido modelo, a análise de HPLC da mistura reaccional evidenciou a formação de uma espécie nova e maioritária a 13,3 min, com λ_{max} de 255 e 294 nm, evidenciando uma aromaticidade típica de aducto com um resíduo de cisteína ligado ao anel aromático. O composto foi isolado, e caracterizado por ^1H -RMN (Figura II.21), ^{13}C -RMN, HSQC (Figura II.22), MALDI-TOF-MS (Figura II.23), e por ESI-MS (Tabela II.23).

Uma evidência mais conclusiva sobre a formação do aducto entre o péptido LQQCPF e NADA, foi obtida através da análise de ^1H -RMN (Figura II.21). No espectro, observam-se os protões típicos da NADA, como o acetilo que surge como singlete, integrado dentro de um multiplete, a 1,80 ppm e o protão H7 do grupo metileno, que aparece como tripleto a 2,55 ppm. Relativamente ao protão H8, surge integrado no multiplete a 2,83-3,23 ppm. Este protão no espectro de HSQC correlaciona com o sinal a 40,7 ppm (C8). Os protões aromáticos da NADA, fundamentais na atribuição deste composto, surgem como singletos a 6,71 e a 6,76 ppm, sendo atribuídos a H6 e a H2, respectivamente. O desvio químico e a multiplicidade destes protões, são característicos de um ataque nucleófilo ao C5 do anel aromático da NADA por um nucleófilo de enxofre, ou seja, o resíduo de Cys do péptido. Esta observação é consistente com os resultados obtidos nas reacções da NADA com a Cys ou a NAcCys, (cf. II.3.1 pág. 40). Como atrás referido, identificou-se como compostos maioritários nestas reacções os aductos 5-Cys-NADA (**76**) e 5-NAcCys-NADA (**21**), e observou-se um perfil característico na zona dos aromáticos nos espectros de ^1H -RMN, do mesmo tipo, do apresentado pelo aducto peptídico.

Ainda no espectro de protão, observam-se alguns sinais cujos desvios químicos apresentam modificações relativamente aos desvios no péptido modelo (Tabela II.22 e Figura II.19). É o caso dos protões metileno H δ da Pro e H β da Cys, que surgem integrados juntamente com os protões H8 e H β da Phe, no multiplete a 2,83-3,23 ppm. Devido ao desvio químico observado nos protões H δ da Pro, é plausível que a geometria tridimensional do aducto peptídico, leve a uma orientação destes protões na vizinhança do cone de blindagem do anel do NADA, ocasionado uma blindagem superior à observada no péptido. Os protões H β da Cys no aducto peptídico aparecem ligeiramente mais desblindados em relação ao péptido, sendo o desvio químico apresentado consistente com a ligação através do átomo de enxofre. Os carbonos foram atribuídos através da análise do espectro de HSQC. O C β da Cys foi atribuído a 36,8 ppm por comparação com os valores obtidos nos aductos monomé-

ricos. O C δ da Pro, foi atribuído a 34,4 ppm ou a 47,2 ppm, uma vez que, não se conseguiu distinguir inequivocamente do C β da Phe. Os dados espectroscópicos analisados, sugerem a formação do aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**).

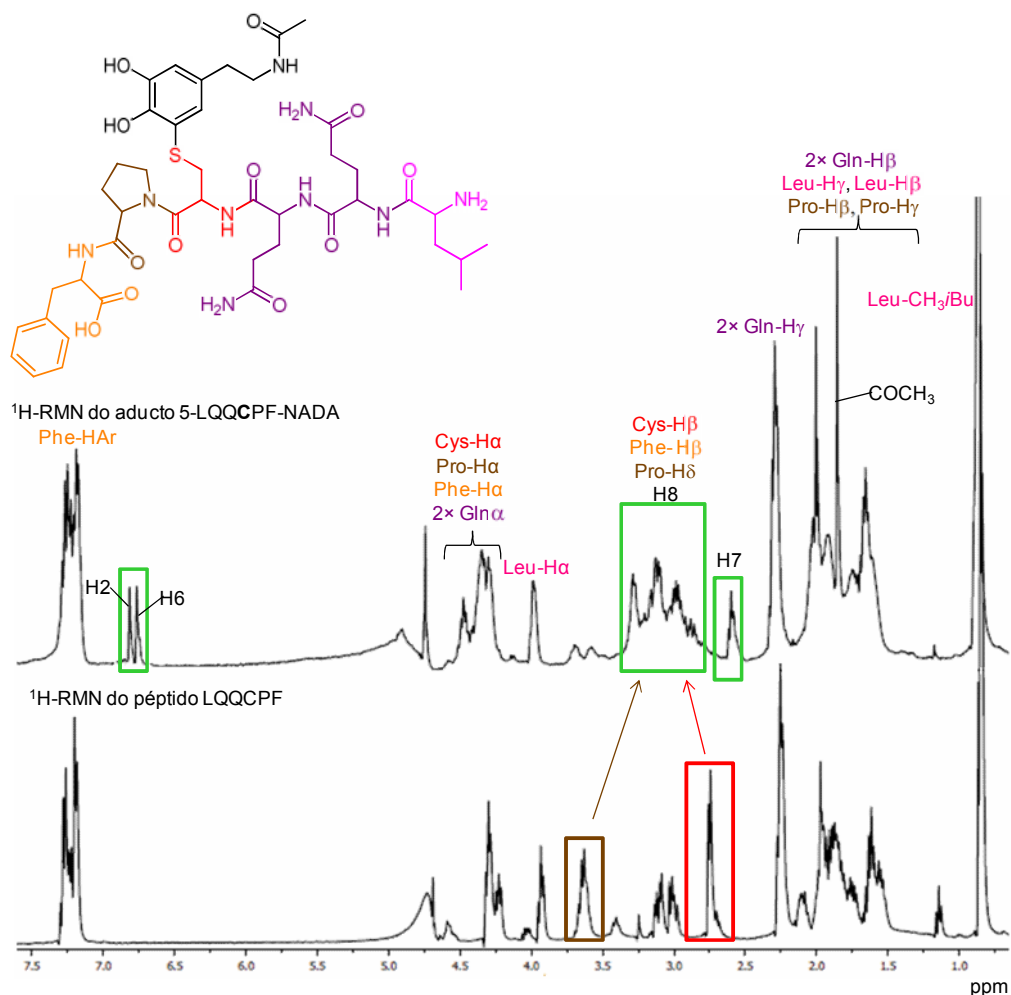


Figura II.21 - Comparação entre os espectros de ¹H RMN (D₂O) do aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**) e do péptido LQQCPF.

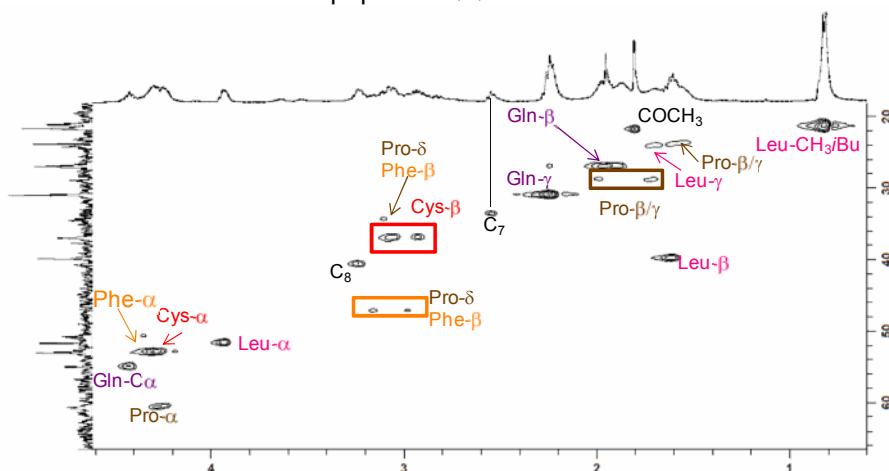
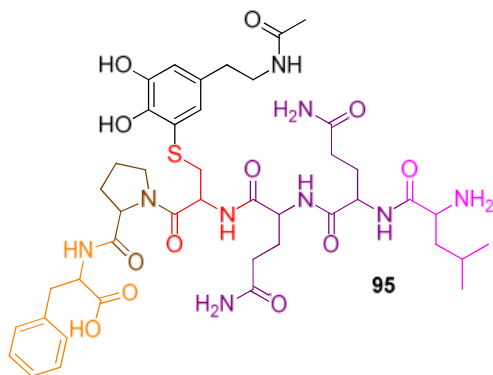


Figura II.22 - Espectro de HSQC do aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**).

Tabela II.23 - Dados espectroscópicos obtidos para do aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**).

¹ H-RMN (D ₂ O) δ (ppm)	¹³ C-RMN (D ₂ O) δ (ppm)	MS (ESI) <i>m/z</i>
	21,0; 21,1 (2×Leu-CH ₃ /Bu)	
0,81-0,82 (6H, m, Leu-CH ₃ /Bu)	21,6 (COCH ₃),	
1,56-1,97 [14H, m, 2× Gln-Hβ + COCH ₃ (1,80) + Leu-Hγ + 2× Pro-Hβ/γ + Leu-Hβ]	23,8 (Pro-Cβ/γ),	
	24,2 (Leu-Cγ),	
2,22-2,26 (4H, m, 2× Gln-Hγ)	26,9 (2×Gln-Cβ),	
2,55 (2H, t, J= 6,8 Hz, H7)	29,1 (Pro-Cβ/γ),	
2,83-3,23 (8H, m, Phe-Hβ + Cys-Hβ + H8 + Pro-Hδ)	30,9 (Gln-Cγ),	
	34,0 (C7),	
3,92-3,94 (1H, m, Leu-Hα)	34,4 (Pro-Cδ/ Phe-Cβ)	950
4,23-4,46 (5H, m, Cys-Hα + Pro-Hα + Phe-Hα + 2× Gln-Hα)	36,8 (Cys-Cβ)	[M + Na] ⁺
	39,8 (Leu-Cβ),	928 [MH] ⁺
6,71 (1H, s, H6)	40,7 (C8)	
6,76 (1H, s, H2)	47,2 (Pro-Cδ/ Phe-Cβ)	
7,12-7,23 (5H, m, Phe-HAr)	51,7 (Leu-Cα),	
	53,0 (Cys-Cα + Phe-Cα),	
	54,9 (Gln-Cα),	
	60,6 (Pro-Cα),	
	117,2 (C6), 126,0 (C2),	
	126,9 (Phe-CAr ₄),	
	128,6; 129,3 (Phe-CAr _{2,6/3,5})	
	136,8 (Phe-CAr ₁),	
	167,8 (CO),	
	170,3;172,3 (2×Gln-CO),	
	172,9; 173,1; 175,8 (CO),	
	177,5 (3x amidaCO)	

Estrutura

Realizou-se o espectro de MALDI-TOF-MS, do aducto peptídico 5-LQQCPF-NADA (**95**) (Figura II.23). O pico a *m/z* de 928, corresponde à adição de uma molécula de NADA ao péptido, ou seja, o aducto protonado, [MH]⁺, e os picos a *m/z* de 950 e 966, aos iões [M + Na]⁺ e [M + K]⁺, respectivamente. O pico a *m/z* de 559 é um ião y₃ (para informação sobre o significado das siglas a/b/y na nomenclatura de iões de fragmentos peptídicos, consultar a nota prévia do capítulo II.7), e corresponde à massa de NADA com os resíduos de Cys, Pro e Phe incorporados (Tabela II.24). Identificou-se o ião y₄ a *m/z* de 687 e o ião b₄ a *m/z* de

666 (Tabela II.24). Os iões y_3 , y_4 e b_4 complementam a informação espectroscópica adquirida, relativamente à identificação da Cys como o resíduo modificado na sequência do péptido. Foi ainda identificado o pico a m/z de 1467, que corresponde ao dímero proveniente do péptido não modificado.

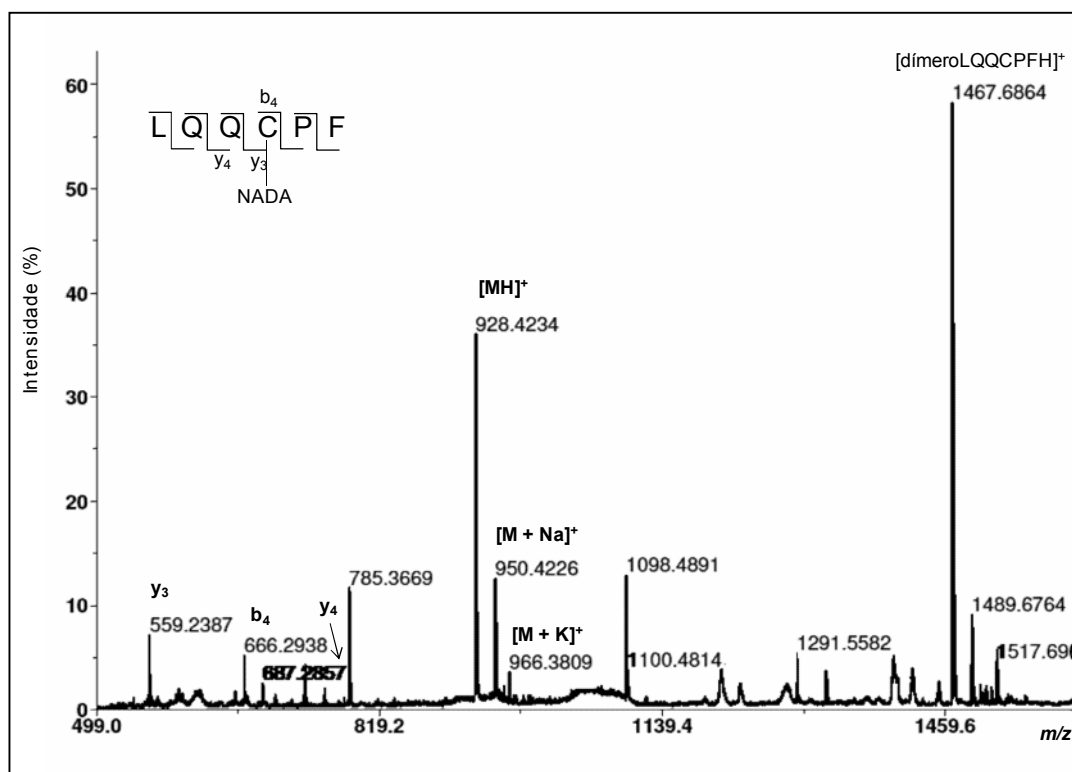


Figura II.23 - Espectro de MALDI-TOF-MS do aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**).

O ião proveniente do aducto **95** protonado, a m/z de 928, foi sujeito a fragmentação, e obtido o respectivo espectro de MALDI-TOF-TOF-MS (Figura II.24). Foram identificados os iões não modificados b_2 , b_3 e y_2 a m/z de 242, 370 e 263, respectivamente e os iões modificados com NADA, b_4 , y_3 e y_4 , a m/z de 666, 559 e 687, respectivamente (Tabela II.24). O incremento de massa observado nos iões b_4 e y_3 , comprova uma vez mais, a modificação no resíduo de Cys.

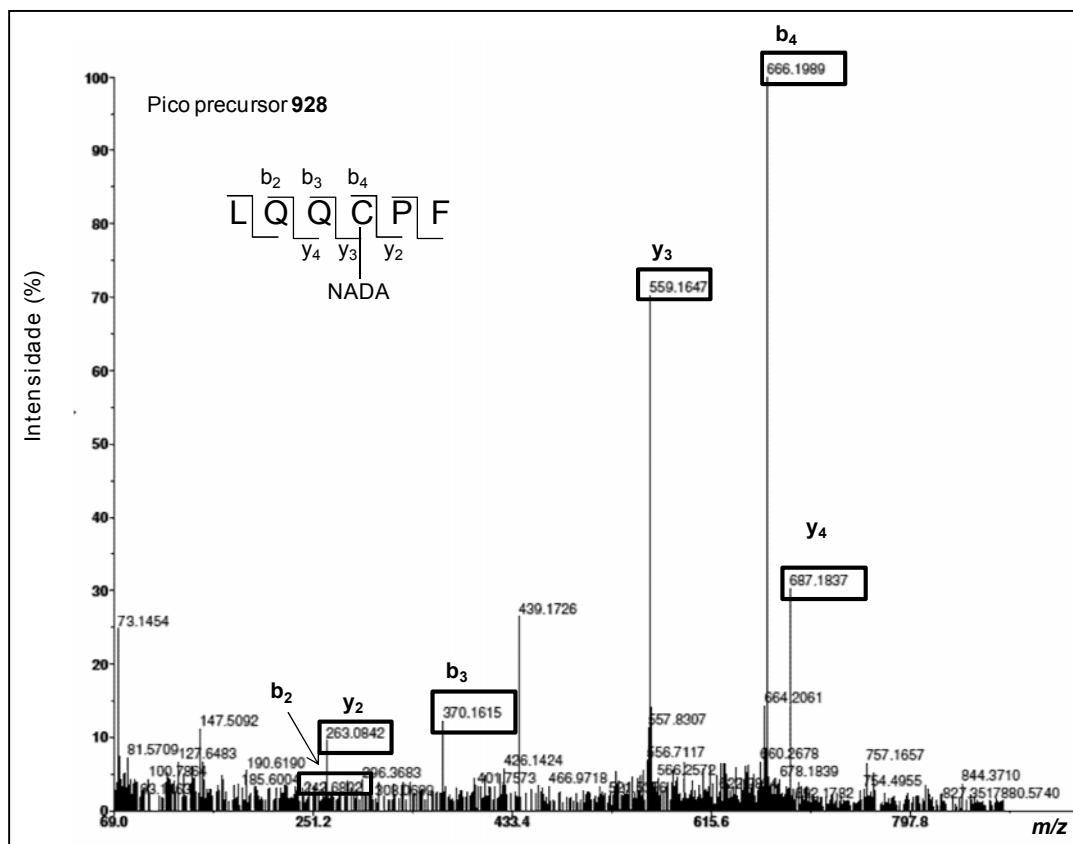


Figura II.24 - Espectro de MALDI-TOF-TOF-MS do ião a m/z de 928, correspondente ao aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**) protonado.

Tabela II.24 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido LQQCPF modificado com NADA.

Sequência peptídica						
	L	Q	Q	C	P	F
ião	1	2	3	4	5	6
b	114	242	370	666	764	910
y	166	263	559	687	816	928

Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

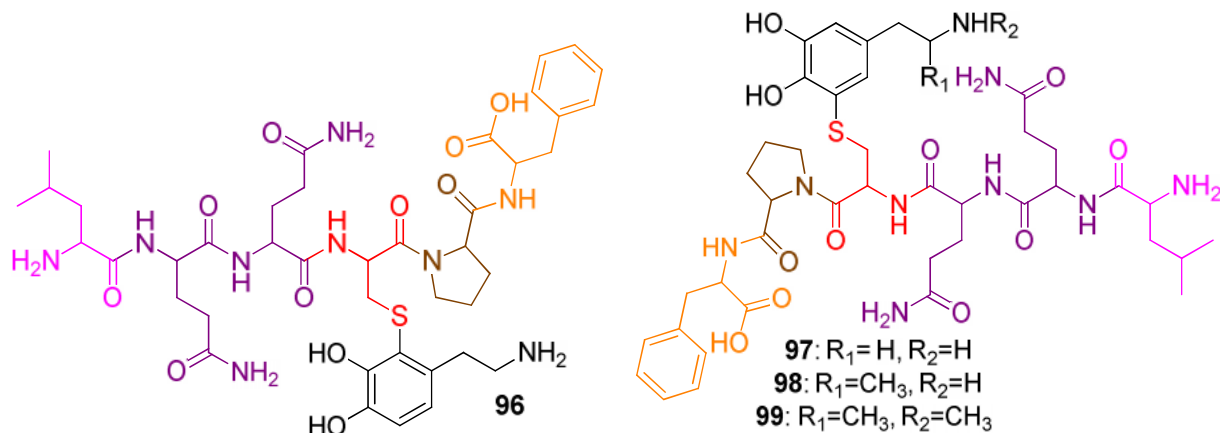
À semelhança do que havia sido efectuado com a reacção da NADA com o péptido modelo, os aductos das reacções de modificação do péptido com a DA, a MeDA e a diMeDA, foram isolados no HPLC semi-preparativo, seguidos de análise por ^1H -RMN e ESI-MS (Tabela II.25). Assim sendo, da reacção da DA foram isolados dois produtos, o 2-LQQCPF-DA (**96**) com t_R de 9,8 min e λ_{max} de 257 e 293 nm e 5-LQQCPF-DA (**97**) com t_R 10,3 min e λ_{max} 256 e 293 nm. Relativamente às reacções de modificação do péptido com os metabolitos do *ecstasy* MeDA, diMeDA, foram isolados dois compostos, o 5-LQQCPF-MeDA (**98**) com t_R de 10,5 min e λ_{max} de 256 e 294 nm, e o 5-LQQCPF-diMeDA (**99**) com t_R = 10,6 min com λ_{max} 256 e 294 nm. A caracterização dos aductos foi realizada por ^1H -RMN, e ESI-MS e

os dados espectroscópicos obtidos estão apresentados na Tabela II.25. A atribuição dos sinais nos espectros de ^1H -RMN dos aductos peptídicos **96**, **97**, **98** e **99** (Tabela II.25), foi efectuada recorrendo à atribuição realizada para o péptido não modificado e para o aducto 5-LQQCPF-NADA (**95**), (Tabela II.22 e Tabela II.23). Os espectros de ^1H -RMN dos aductos peptídicos **96**, **97**, **98** e **99**, apresentam o mesmo tipo de perfil espectroscópico (Figura II.25). Assim sendo, os prótons referentes às CA, H7 e H8, aparecem integrados num multipeto a ca. de 2,82-3,35 ppm. Nos espectros dos produtos da MeDA e diMeDA, são observados os sinais dos prótons H9 do grupo metilo num multipeto, a ca. 1,20-1,22 ppm. A presença do grupo metilo ligado ao grupo amina na diMeDA é identificada pelo singlete a 2,74 ppm. Relativamente aos prótons aromáticos, determinantes para a atribuição da estrutura, à semelhança do efectuado no espectro de ^1H -RMN do composto 5-LQQCPF-NADA (**95**) foram detectados como singlete a ca. de 6,73 e 6,87 ppm, sendo por isso atribuídos a H6 e H2, respectivamente, e aos aductos em 5 da DA, MeDA e diMeDA. No entanto, na reacção da DA foi ainda isolado um aducto com t_R de 9,8 min, cujo espectro de ^1H -RMN (Figura II.25), apresenta na zona aromática dois dupletos com desvios químicos de 6,73 e 6,86 ppm, e constantes de acoplamento de $J = 8,2$ Hz e $J = 7,9$ Hz, típicas de um acoplamento *orto*, sendo por isso atribuídos a H6 e H5, respectivamente, concordante com a presença do aducto 2-LQQCPF-DA (**96**). Os desvios químicos dos prótons do péptido nos aductos, são concordantes com os descritos para o composto 5-LQQCPF-NADA (**95**), e apresentam o mesmo tipo de modificação relativamente ao péptido modelo, ou seja, os prótons H δ da Pro e H β da Cys surgem integrados no multipeto a ca. 1,50-2,50 ppm (Figura II.25).

No espectro de ^1H -RMN do aducto 5-LQQCPF-diMeDA (**99**), os prótons $\text{CH}_3/i\text{Bu}$ da Leu, aparecem separados no multipeto a 0,91-1,02 ppm, demonstrando duas orientações diferentes devido a uma menor mobilidade conformacional, relativamente aos restantes aductos peptídicos caracterizados.

Tabela II.25 - Dados espectroscópicos obtidos para os aductos 2-LQQCPF-DA (**96**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**), 5-LQQCPF-diMeDA (**99**).

Estruturas

¹H-RMN (D₂O) δ (ppm)

Atribuição	Compostos			
	96	97	98	99
Leu-CH ₃ /Bu	0,81	0,84-0,87	0,81-0,83	0,91-1,02
H9	-	-	1,15-1,17	1,23-1,27
(2× Gln-Hβ + Leu-Hγ + 2× Pro-Hβ/γ + Leu-Hβ + 2× Gln-Hγ)	1,56-2,28	1,59-2,79	1,31-2,60	1,55-2,24
N-CH ₃	-	-	-	2,74
(H7 + Phe-Hβ + Cys-Hβ + H8 + Pro-Hδ)	2,89-3,24	2,74-3,25	2,66-3,45	2,99-3,47
Leu-Hα	3,93	3,93-3,95	3,93	4,04
(Cys-Hα + Pro-Hα + Phe-Hα + 2× Gln-Hα)	4,21-4,31	4,25-4,41	4,23-4,42	4,25-4,41
H6	6,73	6,77	6,73	6,84
H5	6,86	-	-	-
H2	-	6,87	6,83	6,89
Phe-HAr	7,13-7,23	7,12-7,24	7,15-7,24	7,12-7,37
925				
MS (ESI) m/z	909 [M + Na] ⁺ 887 [MH] ⁺	[M + K] ⁺ 909 [M + Na] ⁺ 887 [MH] ⁺	901 [MH] ⁺	915 [MH] ⁺

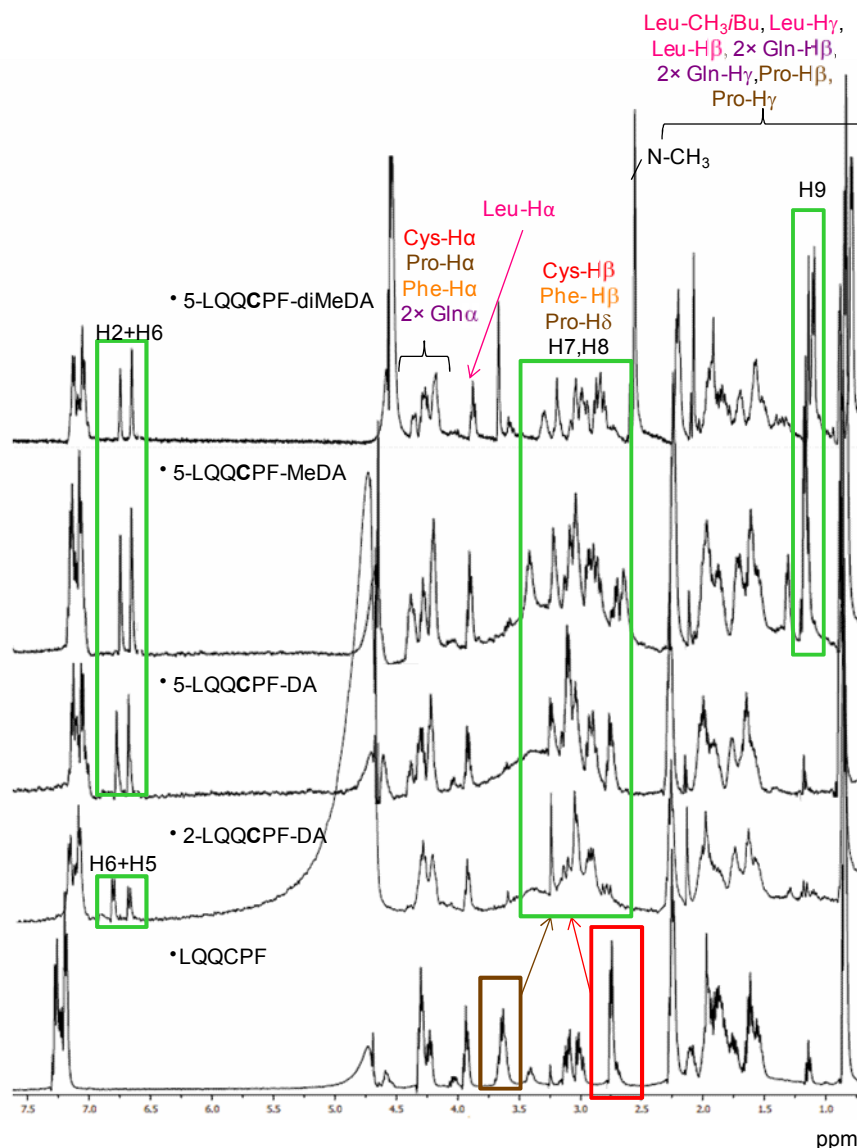


Figura II.25 - Comparação entre os espectros de ^1H RMN (D_2O) dos aductos 2-LQQCPF-DA (**96**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**) e 5-LQQCPF-diMeDA (**99**) e o péptido LQQCPF.

Nas reacções de modificação do péptido com as catecolamina quinonas da MeDA e da diMeDA, foram ainda isolados por HPLC dois aductos, com t_R de 10,2 min e 9,9 min, respectivamente, que apresentavam λ_{max} de 256 e 293 nm, típico de uma modificação por um resíduo de cisteína ao anel aromático. O perfil cromatográfico observado na purificação destes compostos é semelhante ao apresentado na reacção do péptido com a DA, onde o aducto 2-LQQCPF-DA (**96**) foi purificado com o t_R de 9,8 min. Os compostos foram analisados por ^1H -RMN, mas a quantidade reduzida de cada composto não permitiu a aquisição de um espectro com qualidade suficiente para a atribuição das estruturas. No entanto, através da análise de ESI-MS, obteve-se evidência da formação dos aductos peptídicos com a MeDA e a diMeDA, uma vez que os espectros apresentam um sinal com m/z 901 e 915, respectivamente, compatível com a massa do aducto protonado. Contudo os dados espectroscópicos

obtidos são insuficientes para a atribuição das estruturas destas moléculas, que muito provavelmente resultam de um ataque do resíduo de Cys do péptido ao carbono 2 do anel aromático da CA, devido às semelhanças observadas no t_R entre estes aductos e o composto **96**.

Os rendimentos das reacções de modificação do péptido com as catecolaminas, NADA, DA, MeDA e diMeDA, foram cerca de 50 %, no entanto é plausível que possam ser melhorados com a optimização das reacções.

II.7.3.3 Em Resumo:

- Da reacção de modificação do péptido LQQCPF com as CA-quinonas geradas enzimaticamente, foram isolados por HPLC sete aductos peptídicos. O composto 5-LQQCPF-NADA (**95**) foi caracterizado por MALDI-TOF-MS, ESI-MS, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e HSQC, e os produtos 2-LQQCPF-DA (**96**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**) e 5-LQQCPF-diMeDA (**99**) por ESI-MS e ^1H -RMN. Relativamente aos restantes dois compostos foram analisados por ESI-MS, que confirmou ter ocorrido reacção, sendo as estruturas atribuídas a possíveis aductos em dois por comparação quer do perfil do espectro de UV quer do t_R com o aducto 2-LQQCPF-DA (**96**).
- Verificou-se nas diversas reacções de modificação do péptido um perfil cromatográfico análogo, e uma regioselectividade semelhante nos aductos peptídicos.
- A caracterização do péptido modelo por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, e HSQC foi fundamental para a caracterização dos produtos **95**, **96**, **97**, **98** e **99**. Em comparação com o péptido não modificado, as alterações mais significativas ocorreram nos desvios químicos dos prótons metileno H_α da Pro e H_β da Cys.

II.7.4 Determinação da massa intacta das proteínas modificadas HSA, Hb, hhMb por MALDI-TOF-MS

II.7.4.1 Análise de massa intacta da HSA

A primeira aproximação para a modificação da HSA *in vitro* com NADA-quinona oxidada por *mushroom tyrosinase*, teve como base as reacções de modificação com 12-mesiloxi-NVP (**51**) realizadas por Antunes *et al.*⁷² Assim sendo, 10 mg de HSA foram incubados com 5 mg de NADA-quinona, em condições fisiológicas durante a noite, e obteve-se o espectro de MALDI-TOF-MS (Figura II.26b). A extensão de modificação da proteína, foi determinada por subtracção da massa intacta da proteína modificada (Figura II.26b) e nativa (Figura II.26a), atribuídas pelos respectivos espectros de MALDI-TOF-MS, realizados nas mesmas condições. Para o efeito, no espectro de MALDI-TOF-MS da HSA (Figura II.26a), observaram-se dois picos com m/z de 66572 e 33331 Da, que correspondem à molécula protonada (+1) e diprotonada (+2).

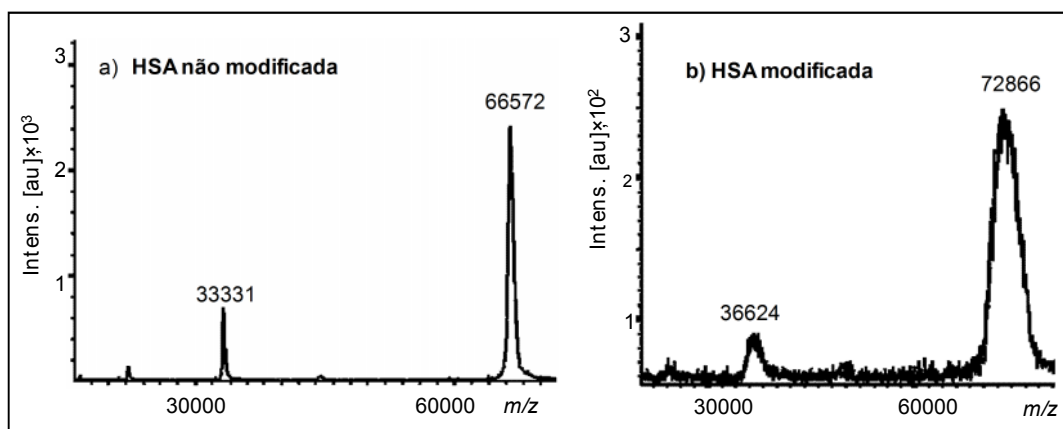


Figura II.26 - Espectro de MALDI-TOF-MS da a) HSA não modificada e b) modificada, numa razão NADA-quinona/HSA de 1:2.

No espectro de MALDI-TOF-MS da proteína modificada (Figura II.26b), foi observado um pico de massa 72866 m/z , referente à espécie protonada, que corresponde ao incremento de 6294 Da, em relação à massa da HSA nativa (66572 m/z). Isto equivale a trinta e dois resíduos de a.a. modificados por mg de proteína, uma vez que a massa da NADA ($C_{10}H_{12}NO_3$) é 194 Da. Uma vez que a HSA possui uma Cys livre muito reactiva,⁶³ esperava-se que este fosse um resíduo modificado, no entanto, a elevada taxa de modificação obtida indica que ocorreu modificação em muitos outros resíduos da HSA.

De modo a obter uma menor taxa de modificação da HSA, fez-se reagir 10 mg de HSA com diferentes quantidades de NADA-quinona, gerada enzimaticamente. Assim sendo, a

razão NADA-quinona/HSA utilizada nos ensaios foi de 1:4, 1:10 e 1:20. Os espectros de MALDI-TOF-MS estão apresentados na Figura II.27 e a taxa de resíduos modificados na Tabela II.26.

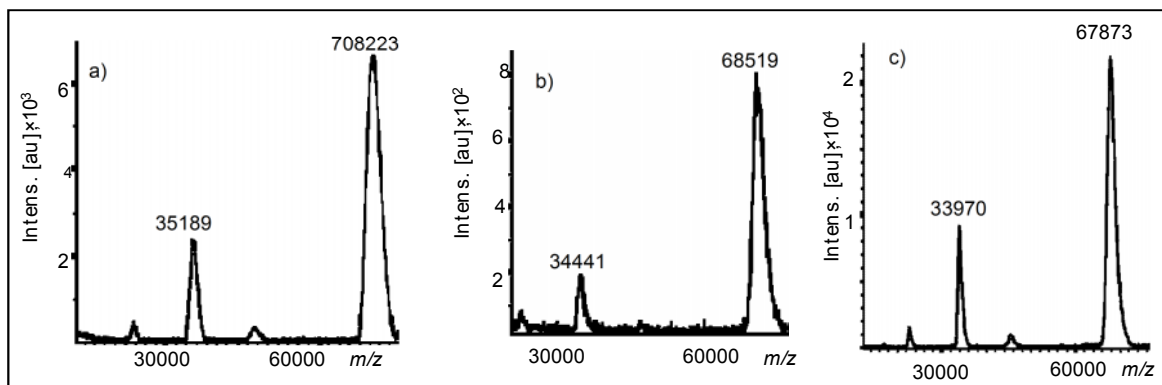


Figura II.27 - Espectros de MALDI-TOF-MS da HSA modificada com diferentes concentrações de NADA-quinona gerada por *mushroom tyrosinase*. A razão NADA-quinona/HSA foi de: a) 1:4, b) 1:10 e c) 1:20.

Tabela II.26 - Massa intacta da HSA modificada por diferentes quantidades de NADA-quinona, usando *tyrosinase* como oxidante.

razão NADA/HSA	NADA-HSA aductos		
	massa (obs.)/(m/z)	incremento de massa	resíduos de a.a. modificados
1:2	72866	6294	32
1:4	70823	4251	21
1:10	68519	1947	9
1:20	67873	1301	6

Pela análise dos espectros de MALDI-TOF-MS das Figura II.26b e Figura II.27, verificamos uma relação de dose-efeito entre a quantidade de NADA-quinona usada por mg de proteína e a extensão de HSA modificada. O grau de modificação da HSA diminui com a quantidade de quinona. No ensaio com uma razão NADA-quinona/HSA de 1:20, obteve-se uma taxa de modificação na ordem dos seis resíduos, bastante aceitável para realizar hidrólise enzimática e identificar os alvos alterados na proteína, proporção esta a utilizada em futuros ensaios. Na verdade uma modificação excessiva da proteína poderia afectar a eficiência da hidrólise subsequente, por afectar a capacidade de reconhecimento dos resíduos por parte das hidrolases.

A relação de dependência entre a quantidade de NADA-quinona usada por mg de proteína e o grau de modificação da HSA, foi também observada quando a quinona foi formada pelo oxidante químico, NaIO_4 , Tabela II.27.

Tabela II.27 - Análise de massa intacta da HSA modificada por NADA, usando NaIO_4 como oxidante.

razão NADA/HSA	NADA-HSA aductos		
	massa (obs.)/(m/z)	incremento de massa	resíduos de a.a. modificados
1:2	77289	10717	54
1:20	68902	2330	11

Ao compararmos as reacções de modificação da HSA, usando a mesma quantidade da NADA, com diferentes oxidantes (NaIO_4 e *mushroom tyrosinase*), verificamos que a extensão de modificação da HSA é superior no caso do oxidante químico (Tabela II.26 e Tabela II.27). Possivelmente devido ao mecanismo das oxidações ser diferente, uma vez que a oxidação NADA a NADA-quinona é um processo de transferência de dois electrões, que pode ocorrer num só passo (*tyrosinase*) ou em duas oxidações sucessivas com transferência de um electrão (NaIO_4). Nos estudos por nós desenvolvidos, sobre as reacções de CA com estes oxidantes e os bionucleófilos de enxofre, verificámos que o NaIO_4 segue um mecanismo radicalar, com formação do radical semi-quinona, que possibilita uma série de outras reacções.³¹

Foram posteriormente estudadas outras CA para a modificação da HSA, numa razão electrófilo/HSA de 1:20, visto ter sido a proporção mais adequada como acima descrito. Especificamente, foram estudadas a quinona da DA (**1**) e dos metabolitos do *Ecstasy*, MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), geradas por oxidação enzimática. A análise do espectro de MALDI-TOF-MS da reacção com **1** revelou um incremento de massa de 58 Da relativamente à massa da HSA nativa, inferior à massa da DA (152 Da). Verificamos que, nenhuma molécula de DA está covalentemente ligada à proteína. Houve possivelmente a formação de polímeros, aquando a oxidação da DA, uma vez que a cor da reacção mudou de vermelho (o-quinona) para preto (cor característica dos polímeros de melanina), e deste modo, não existe em solução DA livre para reagir com a proteína. Além disso, estes compostos podem ainda ter danificado a proteína. No entanto, para os metabolitos MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), verificou-se um incremento de massa de 334 e 360 Da respectivamente, em relação à massa da HSA não modificada, correspondendo a uma média de dois resíduos de a.a modificados por molécula de proteína (Figura II.28).

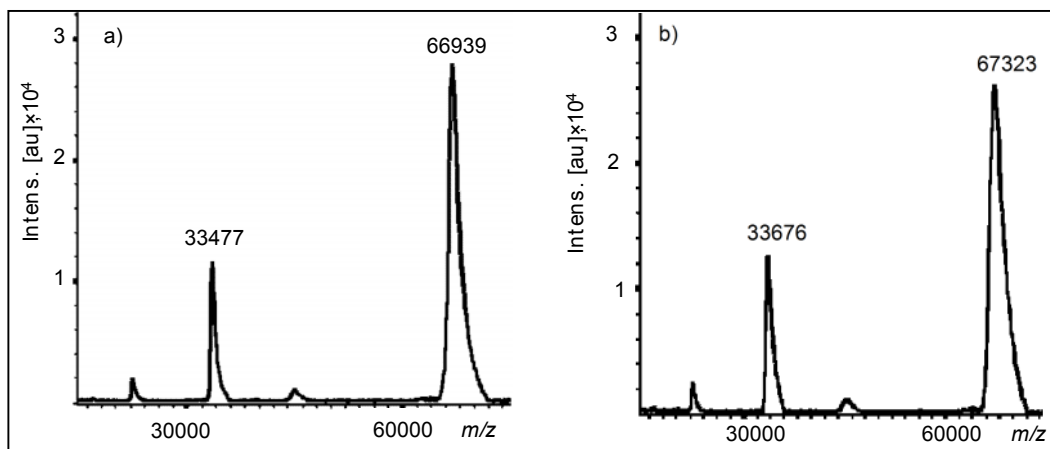


Figura II.28 - Espectros de MALDI-TOF-MS da HSA modificada com os metabolitos do *Ecstasy*
a) MeDA, b) diMeDA.

Ao compararmos a taxa de modificação da HSA com os metabolitos MeDA e diMeDA, com a obtida com NADA na mesma proporção (2 versus 6), verificamos que os metabolitos são menos reactivos. Esta observação é consistente com os menores rendimentos obtidos para a reacção de MeDA e diMeDA com os a.a. Cys e NAcHis, quando comparados com os rendimentos obtidos para as mesmas reacções quando se utilizou NADA.

II.7.4.2 Análise de massa intacta da Hb

A Hb é uma proteína complexa, com duas subunidades α e β com massa molecular distinta.^{79, 81} Na Figura II.29, está representado o espectro de massa da Hb não modificada, onde podemos observar, dois picos maioritários de m/z 15124 e 15865 Da, correspondentes à massa da cadeia α e β , respectivamente e de acordo, com os valores apresentados na literatura.^{82, 83} Para controlo foi realizado o espectro de massa da apohemoglobina (apoHb), e os valores obtidos apresentaram-se, como esperado, dentro da ordem de grandeza dos valores da Hb.

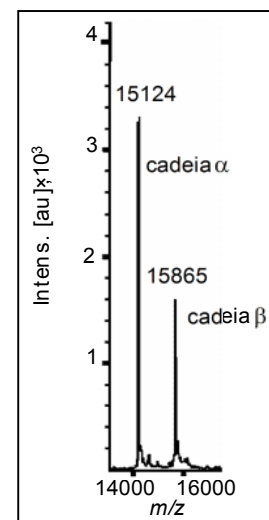


Figura II.29 - Espectro de MALDI-TOF-MS da Hb.

Os espectros de massa intacta das reacções de modificação da Hb com NADA-quinona, mostram o aparecimento de uma série de novos picos, que correspondem a modificações na cadeia α e β . Com o objectivo de avaliar a proporção mais adequada para estudos de hidrólise subsequentes e verificar a influência da concentração da quinona no grau de modi-

ficação da proteína, foram realizados ensaios de modificação da Hb com diferentes concentrações de NADA-quinona gerada por *tyrosinase*. Os ensaios foram efectuados numa proporção de NADA-quinona /Hb de 1:2, 1:4, 1:10 e 1:20 (Figura II.30).

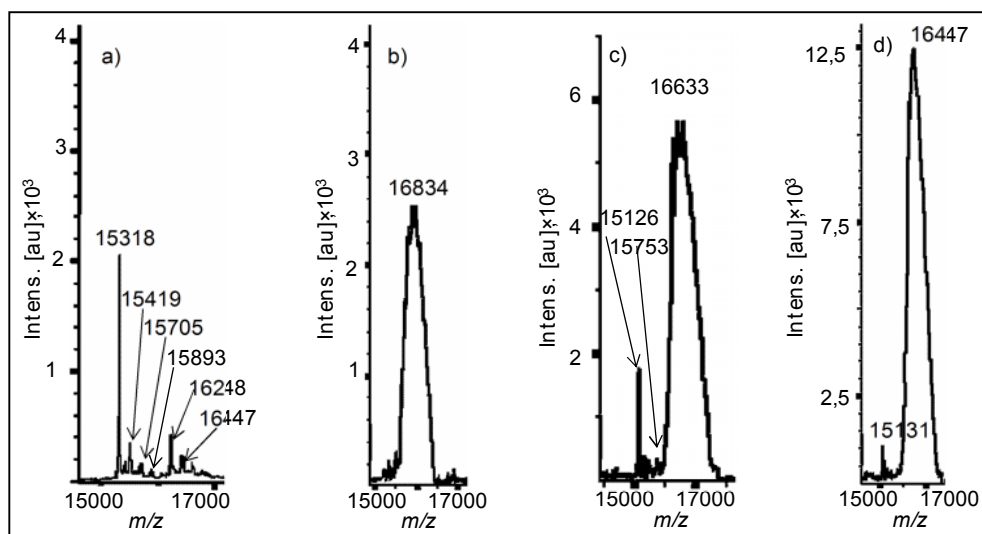


Figura II.30 - Espectros de MALDI-TOF-MS da modificada Hb com NADA-quinona numa razão (NADA/Hb), de: a) 1:2 b) 1:4, c) 1:10, e d) 1:20.

Na reacção entre a NADA-quinona e Hb, realizada numa razão de 1:2, foram observados no espectro de massa (Figura II.30a), picos com m/z de 15318 e 15419 Da, que correspondem à adição de uma molécula de NADA na cadeia α , e picos com m/z de 15511, 15705 e 15893 Da, que correspondem à incorporação de duas e três moléculas de NADA, respectivamente na mesma cadeia. Relativamente à cadeia β , foram obtidos os picos com m/z de 16248, 16294, 16417, que correspondem à adição de duas moléculas de NADA e os picos 16447, 16464, 16619 e 16639 Da, que correspondem à adição de três moléculas de NADA. Na Figura II.30a, estão apresentados alguns dos picos mencionados, os picos maioritários.

Pela análise dos espectros da Figura II.30a-d, verificamos que a extensão de modificação na cadeia β da Hb é sempre superior à da cadeia α . Ou seja, a quinona apresenta maior tendência para modificar resíduos de a.a. da cadeia β , possivelmente porque esta cadeia possui dois resíduos de cisteína com o grupo tiol livre, enquanto que, a cadeia α possui um resíduo.^{79, 81} A Tabela II.28, apresenta a média de a.a. modificados na Hb pelas diferentes concentrações de NADA-quinona.

Tabela II.28 - Taxa de resíduos de a.a. modificados na cadeia α e β da Hb, utilizando diferentes proporções de NADA-quinona.

razão NADA/Hb	taxa de resíduos modificados	
	Hb- α	Hb- β
1:2	1-3	2-3
1:4	-	3-6
1:10	1-3	1-5
1:20	-	2-5

As análises de massa intacta da Hb modificada com NADA numa razão de 1:2 e 1:20, usando NaIO_4 como oxidante, revelaram uma taxa de modificação de 7 resíduos e de 4 (Hb- α) e 1-19 (Hb- β), respectivamente.

II.7.4.3 Análise de massa intacta da hhMb

O espectro de MALDI-TOF-MS da hhMb, apresenta um único pico de massa m/z 16954 (Figura II.31a), muito próxima da massa apresentada na literatura, m/z 16948.⁹⁰ Foi também realizado o espectro de massa da apohhMb (apomioglobina), cujos valores obtidos apresentaram-se numa proporção consistente com os da hhMb.

Para modificação de hhMb com NADA-quinona oxidada enzimaticamente, a proporção electrófilo/proteína utilizada foi de 1:2. O espectro resultante, exhibe o pico da hhMb não modificada e uma série de novos picos, que correspondem à incorporação de 1-6 moléculas de NADA em resíduos da proteína (Figura II.31b).

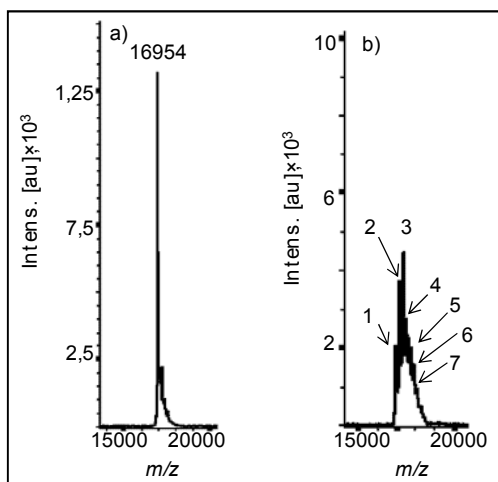


Tabela II.29 - Legenda da Figura II.31b.

Legenda	m/z
1	16954
2	17153
3	17341
4	17534
5	17719
6	17923
7	18091

Figura II.31 - Espectros de MALDI-TOF-MS da a) hhMb, e b) hhMb modificada.

Realizou-se a modificação da hhMb utilizando NaIO_4 como oxidante da NADA, e obteve-se o respectivo espectro de MALDI-TOF-MS. Ocorreu a adição de 1 a 5 moléculas de NADA à hhMb. Este resultado revelou-se muito semelhante ao acima descrito para a reacção com *tyrosinase*. Contudo, para determinar se os resíduos modificados são os mesmos será necessário aplicar outras estratégias. É interessante notar que a hhMb, não possui resíduos de cisteína livre, e que nas modificações com DA, descritas na literatura, foram identificados resíduos de histidina e lisina modificados.³¹

II.7.4.4 Em Resumo:

- A análise de massa intacta das proteínas HSA, Hb e hhMb modificadas com NADA quinona, indica que ocorreu modificação covalente.
- Os espectros de MALDI-TOF-MS obtidos após na modificação das proteínas HSA/ Hb/ hhMb com NADA quinona, mostraram um número mais elevado de moléculas de NADA incorporadas na HSA, revelando uma maior tendência desta proteína para reagir com a espécie electrófila.
- Nas reacções de modificação da HSA com as CA quinonas da NADA, MeDA e diMeDA, para a mesma concentração de proteína/electrófilo verificou-se na reacção da NADA quinona, um maior número de resíduos modificados, indicando uma maior eficiência deste electrófilo. Dada a semelhança estrutural entre os electrófilos, a diferença de eficiência observada poderá estar relacionada com o maior impedimento estereoquímico nos electrófilos metilados.
- Ao compararmos as reacções de modificação da HSA, usando os oxidantes NaIO_4 ou *tyrosinase*, e a mesma quantidade da NADA, verificamos que a extensão de modificação da HSA é superior no caso do oxidante químico.
- O grau de modificação da hhMb, utilizando os oxidantes NaIO_4 ou *mushroom tyrosinase*, e com quantidade de NADA idêntica, revelou-se muito semelhante.

II.7.5 Identificação dos aductos peptídicos por MALDI-TOF-TOF-MS

Para identificação dos resíduos modificados nas proteínas foi adoptada a seguinte aproximação, (i) no serviço de espectrometria de massa da Faculdade Nova de Lisboa, efectuou-se a digestão com a tripsina das proteínas nativas, HSA, Hb e hhMb a péptidos, e os respectivos espectros de MALDI-TOF-MS. Realizou-se ainda a identificação dos péptidos, no motor de busca Mascot,¹²⁶ por comparação dos valores de m/z experimentais e teóricos existentes em programas de bases de dados, como o *SwissProt*. Os resultados obtidos permitiram confirmar a identidade das proteínas e verificar a eficiência das hidrólises. (ii) O mesmo procedimento foi realizado para as proteínas modificadas. (iii) A identificação dos péptidos modificados envolveu a comparação entre os espectros de MALDI-TOF-MS das proteínas nativas e modificadas. A presença de novos picos, no espectro da proteína modificada, foi atribuída a possíveis aductos peptídicos. (iv) Os valores de m/z dos prováveis aductos peptídicos, foram analisados admitindo um incremento de massa consistente com a modificação pelo electrófilo, e comparados com a massa teórica de péptidos originados por digestões *in silico* da proteína em estudo, no programa de pesquisa de base de dados *ExPASy*¹⁰⁸. (v) Os potenciais aductos peptídicos foram seleccionados para fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS, de modo a especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência do péptido; permitindo a sua identificação inequívoca.

II.7.5.1 Identificação dos péptidos por MALDI-TOF-TOF-MS das proteínas HSA, Hb e hhMb

As proteínas HSA, Hb e hhMb foram hidrolisadas aos péptidos, por digestão com a tripsina, e obtidos os respectivos espectros de MALDI-TOF-MS (Figura II.32). Realizou-se ainda a identificação dos péptidos utilizando o motor de busca Mascot e o programa de base de dados *SwissProt* (Tabela II.30, Tabela II.31 e Tabela II.32). Na HSA, foram identificados, 47 péptidos (Tabela II.30), o correspondente a 63 % da sequência da proteína, enquanto na Hb, foram identificados, 13 péptidos (Tabela II.31), o correspondente a 76 % da sequência da proteína, e na hhMb, 15 péptidos (Tabela II.32), o correspondente a 81 % da proteína.

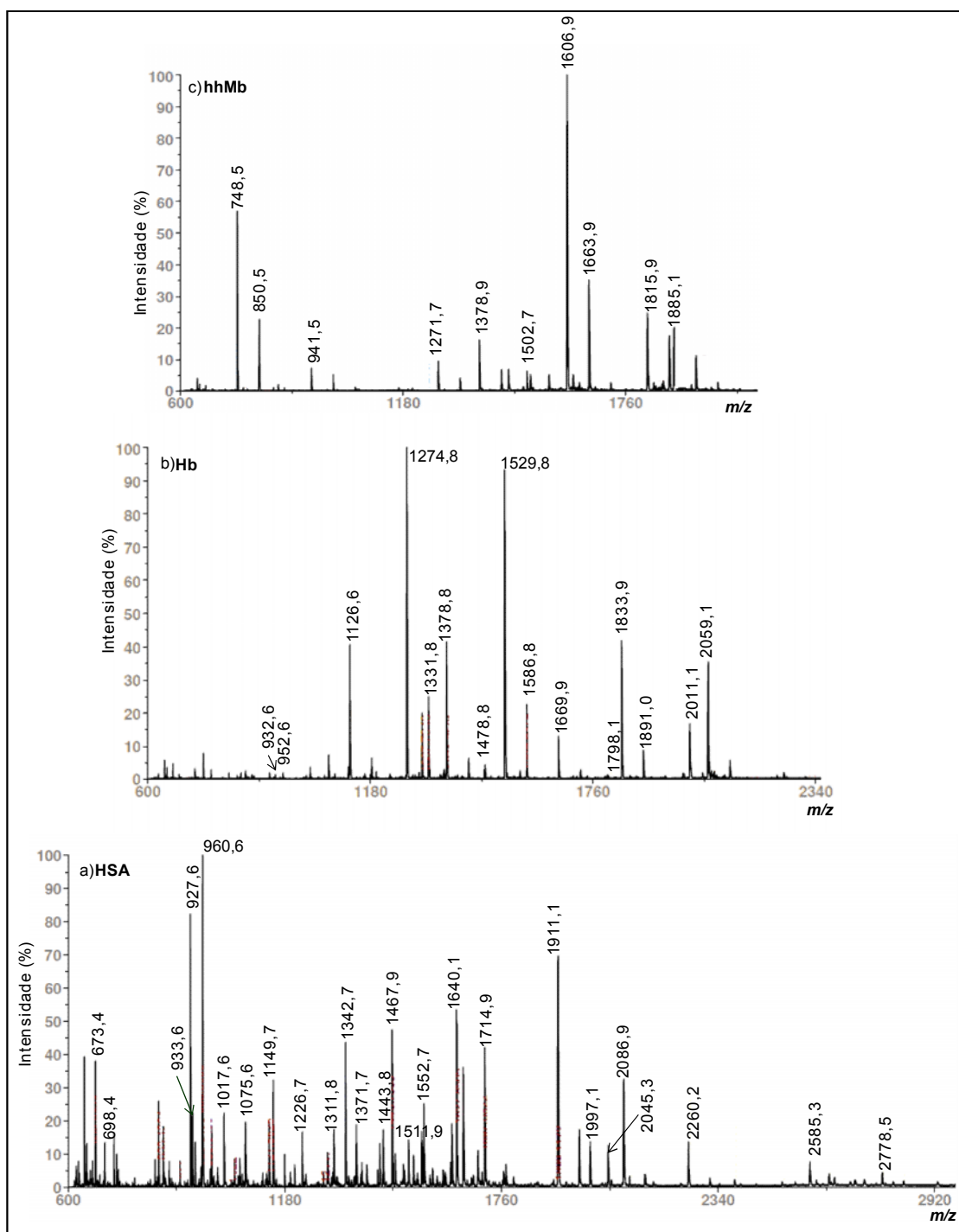


Figura II.32 - Espectros de MALDI-TOF-MS das proteínas HSA, Hb e hhMb hidrolisadas a péptidos com a tripsina. (a) Região do espectro da HSA, entre os 600 e os 2920 m/z . (b) Região do espectro da Hb, entre os 600 e os 2340 m/z . (c) Região do espectro da hhMb, entre os 600 e os 2050 m/z .

Tabela II.30 - Péptidos da HSA identificados.

Posição	Sequência HSA	Massa _{teo} (Da)	Massa _{obs} (Da)
29 - 34	SEVAHR	697,4	698,4
35 - 44	FKDLGEENFK	1225,6	1226,7
66 - 75	LVNEVTEFAK	1148,6	1149,7
89 - 97	SLHTLFGDK	1016,5	1017,6
98 - 105	LCTVATLR	932,5	933,6
106 - 117	ETYGEMADCCAK	1433,5	1434,6
106 - 117	ETYGEMADCCAK ^a	1449,5	1450,4
118 - 130	QEPERNECFLQHK	1713,9	1714,9
123 - 130	NECFLQHK	1074,4	1075,6
123 - 138	NECFLQHKDDNPNLPR	1995,9	1997,1
131 - 138	DDNPNLPR	939,4	940,5
139 - 160	LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK	2649,3	2650,4
139 - 161	LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKK	2777,4	2778,5
161 - 168	KYLYEIAR	1054,6	1055,7
162 - 168	YLYEIAR	926,5	927,6
170 - 183	HPYFYAPELLFFAK	1741,9	1743,0
170 - 184	HPYFYAPELLFFAKR	1897,9	1899,1
187 - 198	AAFTECCQAADK	1370,5	1371,7
206 - 214	LDELRDEGK	1073,5	1074,6
224 - 233	CASLQKFGER	1194,6	1195,6
237 - 246	AWAVARLSQR	1156,6	1157,7
265 - 281	VHTECCHGDLLECADDR	2085,8	2086,9
265 - 286	VHTECCHGDLLECADDRADLAK	2584,1	2585,3
287 - 298	YICENQDSISSK	1442,6	1443,8
287 - 300	YICENQDSISSKLK	1683,8	1684,9
299 - 310	LKECCEKPLLEK	1545,7	1546,9
301 - 310	ECCEKPLLEK	1304,6	1305,7
342 - 347	NYAEAK	694,3	695,4
361 - 372	RHPDYSVLLLLR	1466,8	1467,9
362 - 372	HPDYSVLLLLR	1310,7	1311,8
362 - 375	HPDYSVLLLLRLAK	1622,9	1623,9
376 - 383	TYETTLEK	983,5	984,6
384 - 396	CCAAADPHECYAK	1551,5	1552,7

Posição	Sequência HSA (continuação)	Massa_{teo} (Da)	Massa_{obs} (Da)
397 - 413	VFDEFKPLVEEPQNLIK	2044,1	2045,3
414 - 426	QNCELFEQLGEYK	1656,7	1657,9
427 - 434	FQNALLVR	959,6	960,6
438 - 452	KVPQVSTPTLVEVSR	1638,9	1640,1
439 - 452	VPQVSTPTLVEVSR	1510,8	1511,9
509 - 524	RPCFSALEVDETYVPK	1909,9	1911,1
525 - 543	EFNAETFTFHADICTLSEK	2259,0	2260,2
525 - 545	EFNAETFTFHADICTLSEKER	2544,2	2545,3
544 - 548	ERQIK	672,4	673,4
549 - 558	KQTALVELVK	1127,7	1128,8
500 - 508	CCTESLVNR	1137,5	1138,6
550 - 558	QTALVELVK	999,6	1000,7
570 - 581	AVMDDFAAFVEK	1341,6	1342,7
585 - 597	ADDKETCFAEEGK	1498,6	1499,8

^a Oxidação**Tabela II.31** - Péptidos da Hb identificados.

Posição	Sequência Hb	Massa_{teo} (Da)	Massa_{obs} (Da)
1 – 18	MVHLTPEEKSAVTALWGK	1996,0	1997,1
2 – 9	VHLTPEEK	951,5	952,6
10 – 18	SAVTALWGK	931,5	932,6
19 – 31	VNVDEVGGEALGR	1313,7	1314,7
32 – 41	LLVVYPWTQR	1273,7	1274,8
42 – 60	FFESFGDLSTPDAVMGNPK	2057,9	2059,1
42 – 60	FFESFGDLSTPDAVMGNPK ^a	2073,9	2075,1
42 – 62	FFESFGDLSTPDAVMGNPKVK	2285,1	2286,5
67 – 83	KVLGAFSDGLAHLNLIK	1796,9	1798,1
68 – 83	VLGAFSDGLAHLNLIK	1668,9	1669,9
84 – 96	GTFATLSELHCDK	1477,7	1478,8
97 - 105	LHVDPENFR	1125,6	1126,6
122 - 133	EFTPPVQAAYQK	1377,7	1378,8

^a Oxidação

Tabela II.32 - Péptidos da hhMb identificados.

Posição	Sequência hhMb	Massa _{teo} (Da)	Massa _{obs} (Da)
2 - 17	GLSDGEWQQVLNVWGK	1814,8	1815,9
18 - 32	VEADIAGHGQEVLR	1605,8	1606,9
33 - 43	LFTGHPETLEK	1270,6	1271,7
33 - 46	LFTGHPETLEKFDK	1660,8	1661,9
44 - 48	FDKFK	683,4	684,4
65 - 78	HGTVVLTALGGILK	1377,8	1378,9
65 - 79	HGTVVLTALGGILKK	1505,9	1506,9
80 - 97	KGHHEAELKPLAQSHATK	1981,0	1982,1
81 - 97	GHHEAELKPLAQSHATK	1852,9	1854,0
104 - 119	YLEFISDAIIHVLHVK	1884,0	1885,1
120 - 134	HPGDFGADAQGAMTK	1501,7	1502,7
120 - 134	HPGDFGADAQGAMTK ^a	1517,7	1518,7
135 - 140	ALELFR	747,4	748,5
147 - 154	YKELGFQG	940,5	941,5
149 - 154	ELGFQG	649,3	650,3

^a Oxidação

II.7.5.2 Modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2

As proteínas HSA, Hb e hhMb foram modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, sendo a quinona, gerada com *mushroom tyrosinase* (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO₄ (Ensaio: “Proteína-B”). Após digestão com a tripsina, realizou-se os espectros de MALDI-TOF-MS, e no motor de busca Mascot, foram identificados os péptidos que não sofreram modificação.

Foram efectuadas duas condições de hidrólise com a tripsina (Tabela II.33). Na digestão enzimática clássica (cf. secção III.17.1.1 pág. 191), realizou-se a redução das cisteínas e respectiva acetilação, antes de adicionar a tripsina numa razão tripsina/proteína de 1:20. Na outra hidrólise, não foi realizado qualquer tratamento prévio da amostra antes da adição da tripsina e a proporção tripsina/proteína utilizada foi de 1:200 (método geral B, cf. secção III.17.1.1 pág.191).

Tabela II.33 - Resultados do motor de busca Mascot da HSA, Hb e hhMb não modificadas e modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, após hidrólise com a tripsina realizada segundo o método geral B ou por digestão enzimática clássica (*).

Ensaio	Resultados Mascot		
	Base de dados	Péptidos identificados	% de proteína identificada
HSA*	<i>SwissProt</i>	47	63
HSA-A	MSDB	22	31
HSA-A*	MSDB	22	39
HSA-B	proteína não identificada		
HSA-B *	<i>SwissProt</i>	36	55
Hb	<i>SwissProt</i>	16	93
Hb*	<i>SwissProt</i>	13	76
Hb-A	<i>SwissProt</i>	7	54
Hb-A*	proteína não identificada		
Hb-B	proteína não identificada		
Hb-B*	proteína não identificada		
hhMb	<i>SwissProt</i>	17	90
hhMb*	<i>SwissProt</i>	15	81
hhMb-A	<i>SwissProt</i>	15	77
hhMb-A*	<i>SwissProt</i>	15	78
hhMb-B	<i>SwissProt</i>	13	84
hhMb-B*	<i>SwissProt</i>	15	84

Para a hhMb (Tabela II.33), verificou-se que a eficiência dos dois métodos de hidrólise é muito semelhante, uma vez que o número de péptidos e a respectiva % de proteína identificada, são praticamente idênticos. Assim sendo, o tratamento prévio realizado antes da adição da tripsina na digestão clássica, não é necessário nesta proteína, o que não surpreende visto que, na sua sequência não existe nenhum resíduo de cisteína. Deste modo, para a hidrólise a péptidos da hhMb nativa ou modificada por espécies electrófilas o método geral B é suficiente, sendo frequentemente utilizado por outros autores.^{31, 64, 89, 127, 128} A salientar ainda que a quantidade de enzima utilizada no método geral B foi 10 vezes menor que na hidrólise enzimática clássica, reforçando a eficiência do método.

Na HSA a tripsinização clássica (Tabela II.33) apresentou resultados mais eficientes do que o método geral B, dado permitir a quebra das pontes de disulfureto com bloqueamento dos tióis libertados, que impede a reoxidação. Por esta razão trata-se do método frequentemente utilizado para a digestão da HSA modificada por electrófilos reactivos.^{69, 75}

Relativamente à Hb, os resultados obtidos demonstram que o método geral B revelou-se ligeiramente mais eficaz que a digestão enzimática clássica. Possivelmente porque o número de cisteínas na Hb, uma na cadeia α e duas na cadeia β , não justifica o tratamento prévio antes da tripsinização. Outros autores, também realizaram a digestão da Hb modificada por BMO (55) ou HHPA (59), segundo este método.^{82, 83}

Nas reacções de modificação da HSA, verificou-se um decréscimo significativo no número de péptidos identificados relativamente à proteína nativa (Tabela II.33). Este decréscimo, resulta possivelmente de uma elevada modificação da proteína, 32 resíduos no ensaio HSA-A e 54 no ensaio HSA-B (cf. secção II.7.4.1 pág. 91), que provavelmente condicionou a acção da tripsina, realizando uma hidrólise menos eficiente. Além disso, segundo Aldini *et al.* a tripsina não reconhece os resíduos de Lys modificados.⁷⁴

Nas reacções realizadas com as CA quinonas e os monómeros (por exemplo a Cys, a Lys e a His), verificamos uma eficiência muito superior do nucleófilo de enxofre em comparação com o azoto. A HSA contém 35 resíduos de cisteína, 34 dos quais em pontes dissulfureto, sendo a única cisteína livre a Cys34,^{63, 70, 72, 73} frequentemente identificada como resíduo modificado por vários tipos de electrófilos.^{72, 75} Tendo em conta a existência de uma única cisteína livre na proteína nativa, foi algo surpreendente a elevada modificação obtida. Uma possível explicação será a ocorrência de redução nas pontes de dissulfureto, tendo em conta a natureza redox do par quinona/catecol, que terá libertado um número substancial de átomos de enxofre para ataque nucleófilo. Na Tabela II.34, onde se apresenta os péptidos da HSA que possivelmente sofreram modificação pela NADA quinona, podemos observar que muitos possuem resíduos de Cys (por exemplo: **CCTESLVNR**, **CASLQKFGGER**, **QNCELFEQLGEYK**, **EFNAETFTFHADICTLSEK**), o que vem ao encontro da nossa hipótese. Dado o elevado grau de modificação da proteína, é no entanto plausível que tenha ocorrido modificação de outros resíduos.

Na hhMb identificou-se um número de péptidos semelhante, estando a proteína modificada ou não (Tabela II.33), significando que a modificação da proteína foi pouco extensa.

Para identificação dos péptidos modificados, comparou-se os espectros de MALDI-TOF-MS das proteínas não modificadas e modificadas (Figura II.33). Nos espectros das proteínas modificadas, a presença de novos picos com valores de m/z compatíveis com um incremento de massa até 3×194 Da, foi atribuída a possíveis aductos peptídicos (Tabela II.34). Os valores de m/z dos prováveis aductos peptídicos, foram comparados com a massa teórica de péptidos originados por digestões *in silico* da proteína em estudo, no programa de pesquisa de base de dados *ExPASy*¹⁰⁸. Foram excluídos da análise, os picos da auto-digestão da tripsina, com valores de m/z de 842,5, 1045,6, 2211,11, e 2225,1 Da. Foram também

excluídos os picos da digestão da queratina (um contaminante frequente) com m/z de 973,5, 1033,5, 1179,6; 1265,6; 1277,7; 1302,7; 1316,5; 1332,5; 1357,7; 1383,7; 1475,8 e 2383,9 Da.

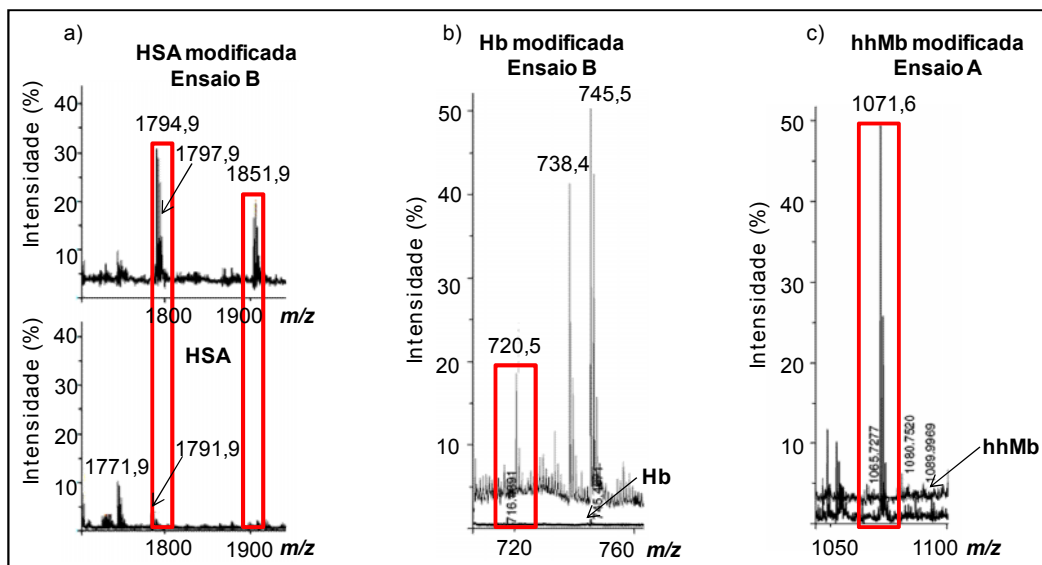


Figura II.33 - Espectro de MALDI-TOF-MS dos péptidos das proteínas (a) HSA (b) Hb e (c) hhMb modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2 e nativas.

Para identificação inequívoca dos potenciais aductos peptídicos apresentados na Tabela II.34, realizou-se a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS, possibilitando especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência peptídica.

Tabela II.34 - Identificação dos possíveis aductos peptídicos das proteínas HSA, Hb e hhMb com a NADA.

Ensaio	Massa_{obs} (Da)	Massa_{teo} (Da)	Δ massa (Da)	Sequência
HSA-A	867,2	672,4	194,8	ERQIK
	1085,6	890,5	195,1	LKCASLQK
	1194,7	999,6	195,1	QTALVELVK
	1218,5	1024,4	194,1	CCTESLVNR
	1277,3	1083,5	193,8	YLYEIARR
	1332,6	1138,5	194,1	CASLQKFGER
	1852,1	1656,7	195,4	QNCELFEQLGEYK
HSA-B	867,1	672,4	194,7	ERQIK
	1085,8	890,5	195,3	LKCASLQK
	1126,5	932,5	194,0	LCTVATLR
	1154,5	959,6	194,9	FQNALLVR
	1277,2	1083,5	193,7	YLYEIARR
	1331,6	1137,5	194,1	CCTESLVNR
	1536,7	1341,6	195,1	AACLLPKLDEL
	1794,9	1600,7	194,2	QNCELFEQLGEYK
	1816,9	1622,9	194,0	HPDYSVVLRLAK
	1851,9	1656,7	195,2	QNCELFEQLGEYK
Hb-A	833,2	639,4	193,8	VKAHGK
	1320,6	1126,6	194,0	LHVDPENFR
Hb-B	720,5	526,3	194,2	GHGKK
	833,5	639,4	194,1	VKAHGK
	1320,7	1126,6	194,1	LHVDPENFR
	1365,6	1171,7	193,9	VLSPADKTNVK
	1765,9	1571,8	194,1	FLASVSTVLTISKYR
hhMb-A	1071,6	684,3	387,3	FDKFK
	1256,2	1062,6	193,6	FDKFKHLK
	1329,9	941,5	388,4	YKELGFQG
hhMb-B	2050,1	1661,8	388,3	LFTGHPETLEKFDK
	2203,2	1815,9	387,3	GLSDGEWQQVLNVWGK
	2241,1	1853,9	387,2	GHHEAELKPLAQSHATK

Nas reacções de modificação da HSA, os resultados da análise de massa intacta revelaram 32 resíduos modificados no ensaio HSA-A e 54 no ensaio HSA-B, e através da comparação dos espectros de MALDI-TOF-MS das proteínas modificadas e nativas, foram identificados 6 e 10 possíveis péptidos modificados, respectivamente (Tabela II.34). Em ambas as reacções de modificação da HSA, foi observado um pico com m/z de 940,7 (ião omitido da Tabela II.34 face ao apresentado), compatível com o aumento de 193,3 Da no péptido com m/z de 747,4 (ASSAKQR), ou com o péptido da HSA não modificado DDNPNLPR. Este ião foi sujeito a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS (Figura II.34). Foram observados pequenos fragmentos a m/z 175, 317 e 624, potencialmente consistentes com iões y_1 , b_4 e y_3 , do péptido ASSAKQR. No entanto, as observações são mais consistentes com uma fragmentação do péptido não modificado DDNPNLPR, já que foi possível atribuir os iões b_2 (m/z 231), b_3 (m/z 345), b_5 (m/z 556) e b_6 (m/z 669) e os iões y_1 (m/z 175), y_5 (m/z 596), y_6 (m/z 710), e y_7 (m/z 825), (Tabela II.35), com uma intensidade substancial. Pelo número de fragmentos identificados e pela intensidade dos mesmos, conclui-se que o pico com m/z de 940,7 corresponde ao péptido não modificado, DDNPNLPR. Em resultado do exposto, o pico com valor de m/z de 940,7 foi omitido da Tabela II.34.

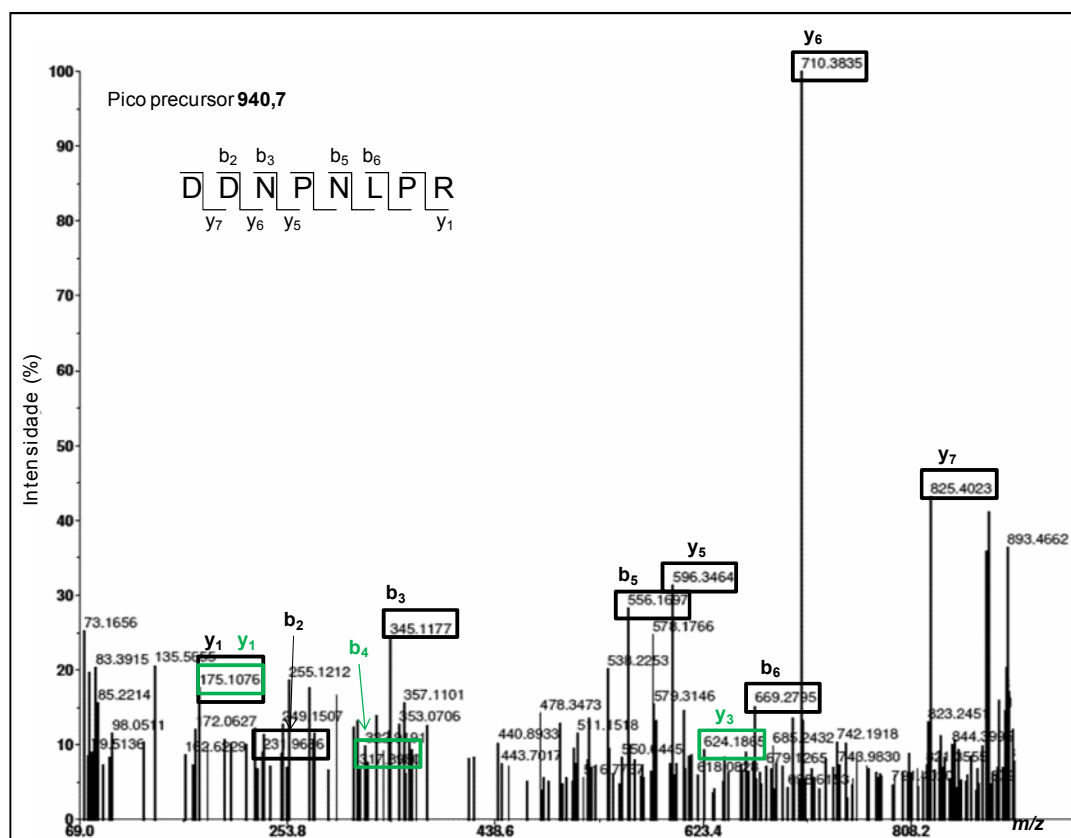


Figura II.34 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA não modificado, DDNPNLPR, com os respectivos fragmentos peptídicos a preto. A verde os iões b/y do possível péptido modificado da HSA, ASSAKQR.

Tabela II.35 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido da HSA, DDNPNLPR.

Sequência peptídica								
	D	D	N	P	N	L	P	R
ião	1	2	3	4	5	6	7	8
b	116	231	345	442	556	669	766	922
y	175	272	385	499	596	710	825	940

Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

Na Figura II.33a, referente à HSA, verificamos que no espectro da proteína modificada, surgem dois novos picos com m/z de 1794,9 e 1851,9 com um incremento de massa de ca. 194 Da, compatível com a modificação pela NADA. A modificação foi atribuída aos péptidos com valores de m/z de 1600,7 e 1656,7, respectivamente, com a seguinte sequência peptídica de QN**C**ELFEQLGEYK e QN**C***ELFEQLGEYK (C*- artefacto resultante da reacção da cisteína com a iodoacetamida durante o processo pré -tripsinização). Para identificação inequívoca dos péptidos modificados, tentou-se a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS dos picos com m/z de 1794,9 e 1851,9, mas a análise foi inconclusiva. Tendo em atenção que a eficiência do processo de fragmentação foi confirmada pela análise do péptido, acima descrita, é plausível que a baixa intensidade dos péptidos modificados tenha inviabilizado a obtenção de resultados inequívocos.

No espectro de MALDI-TOF-MS da Hb modificada (Figura II.33b), observou-se um novo pico com m/z de 720,5; que corresponde ao incremento de 194,2 Da no péptido com m/z de 526,3 (GHGKK). Na Figura II.33c, referente à modificação da hhMb, o espectro mostra um novo pico com m/z de 1071,6; correspondente ao aumento de 387,3 Da em relação ao péptido FDKFK, com m/z de 684,3; ou seja muito provavelmente duas moléculas de NADA foram adicionadas. Ambos os iões (m/z 720,5 e 1071,6) foram sujeitos a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS (Figura II.35 e Figura II.36).

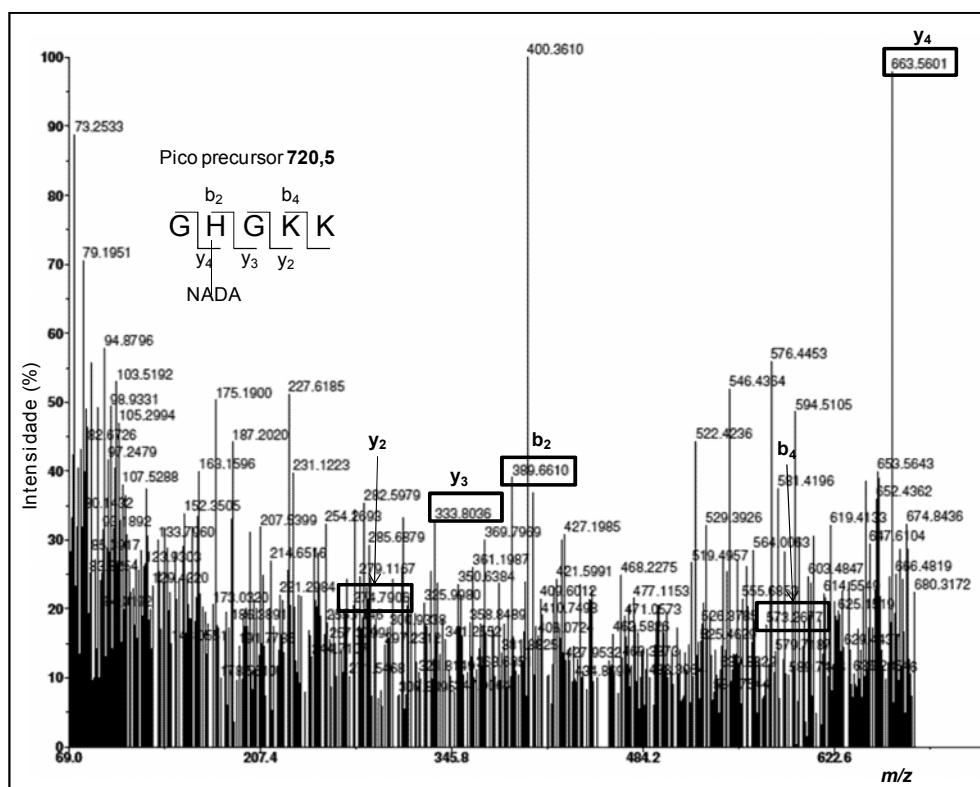


Figura II.35 - Espectro de MS/MS do péptido da Hb modificado, GHGKK.

No espectro de MS/MS do pico da Hb com m/z de 720,5; compatível com a modificação do péptido GHGKK, na posição 57-61 da Hb- α , identificaram-se os iões não modificados y_2 (m/z 275) e y_3 (m/z 333) e os iões modificados com NADA, b_2 (m/z 389), b_4 (m/z 573) e y_4 (m/z 663), (Tabela II.36). O resíduo de Gly59 e ambos os resíduos de Lys60 e 61, não sofreram modificação, pois não se observa um aumento de massa em y_2 e y_3 . No entanto, o ião y_4 apresenta um incremento de massa compatível com a modificação com NADA, sugerindo que a modificação ocorreu no resíduo de His58. Esta observação é suportada pela identificação do ião b_2 modificado, no resíduo de His58, concluindo-se que o péptido GHGKK foi modificado no resíduo de histidina.

Tabela II.36 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido modificado da Hb- α , GH(NADA)GKK.

Sequência peptídica					
	G	H	G	K	K
ião	1	2	3	4	5
b	58	389	445	573	702
y	147	275	333	663	720

Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

A Figura II.36, apresenta o espectro de MALDI-TOF-TOF-MS do ião com m/z de 1071,6; compatível com uma adição de duas moléculas de NADA no péptido FDKFK, na posição 43-47 da hhMb. Identificou-se o ião y_1 não modificado (m/z 147) e o ião y_3 modificado (m/z 615) com uma molécula de NADA, ou seja, uma das espécies de NADA reagiu com o resíduo de Lys45. A outra espécie, teria necessariamente de reagir no resíduo de Phe43 ou de Asp44, no entanto, não foram detectados iões com valores de m/z compatíveis. Os dados apresentados sugerem a modificação do péptido FDKFK da hhMb, no resíduo de Lys45, e num dos resíduos de Phe43 ou de Asp44.

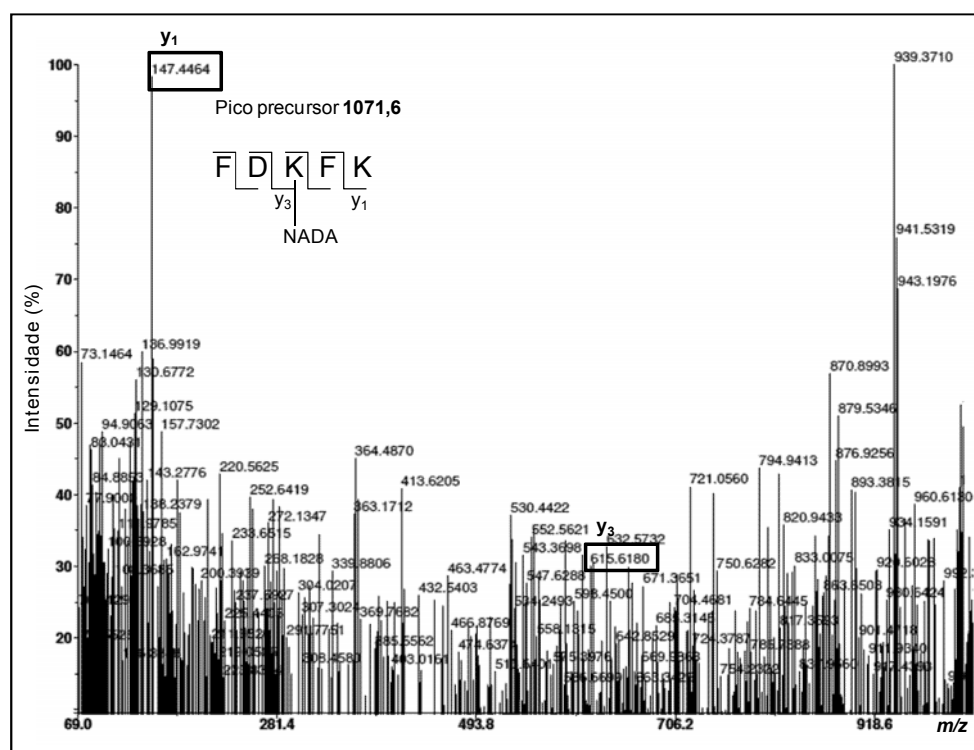


Figura II.36 - Espectro de MS/MS do possível péptido da hhMb modificado, FDKFK.

Tabela II.37 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido modificado da hhMb, FDKFK.

Sequência peptídica					
	F	D	K	F	K
ião	1	2	3	4	5
b	148/341*	456*	777**	924**	1154
y	147	294	615	730/923**	1072

Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

* Ião com incremento de massa de 194 Da. ** Ião com incremento de massa de 2×194 Da.

À semelhança do descrito acima para os iões com m/z de 1794,9 e 1851,9 do ensaio HSA-B, a maioria das análises de MS/MS dos possíveis péptidos modificados apresentados

na Tabela II.34, revelou-se inconclusiva, possivelmente devido à baixa intensidade dos péptidos modificados, que inviabilizou a obtenção de fragmentos peptídicos, fundamentais para uma identificação inequívoca.

No entanto, o espectro de MS/MS do pico com m/z de 720,5; no ensaio Hb- β , apresentou um padrão de fragmentação que permitiu a identificação do péptido, GH(NADA)GKK, e do resíduo modificado, a His58. O mesmo sucedeu com o íão com m/z de 1085,6; no ensaio HSA- β , e o íão com m/z de 1320,8; no ensaio Hb- β . No espectro de MS/MS do pico com m/z de 1085,6; observou-se os íões b_1 (m/z 114), b_3 (m/z 345), b_5 (m/z 503) e b_7 (m/z 938) e os íões y_3 (m/z 581), y_6 (m/z 842), consistentes com a modificação do péptido LKASLQK (198-205). Os íões b_7 , y_3 e y_6 apresentam um valor de m/z compatível com um incremento de 194 Da, possivelmente modificados com NADA. Uma vez que, o aumento de massa nos íões b foi no fragmento b_7 , a modificação ocorreu no resíduo de Gln204, visto a Leu203 não ser nucleófila (Tabela II.38).

Tabela II.38 - Análise do péptido modificado LKASLQK da HSA, no resíduo de Gln204.

Sequência peptídica								
	L	K	C	A	S	L	Q	K
íão	1	2	3	4	5	6	7	8
b	114	242	345	416	503	616/809*	937	1067
y	147	275/468*	581	668	739	842	971	1085

Os íões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

* Íão com incremento de massa de 194 Da.

O pico com m/z de 1320,8; exibiu no espectro de MALDI-TOF-TOF-MS os fragmentos a m/z 175, 444, 659 e 1146, consistentes com os íões y_1 , b_2 , b_4 e b_8 do péptido LHVDPENFR, na posição 96-104 da Hb- β . Os fragmentos b_2 , b_4 e b_8 apresentam um valor de m/z compatível com a modificação com NADA, que provavelmente ocorreu no resíduo de His97 (Tabela II.39).

Tabela II.39 - Análise de MALDI-TOF-TOF-MS péptido da Hb- β modificado, LH(NADA)VDPENFR.

Sequência peptídica									
	L	H	V	D	P	E	N	F	R
íão	1	2	3	4	5	6	7	8	9
b	114	444	543	659	755	884	998	1146	1302
y	175	322	436	565	662	777	876	1207	1320

Os íões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.

Nos ensaios de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb com NADA, numa proporção NADA/proteína 1:2, os resultados obtidos nos espectros de MALDI-TOF-TOF-MS revelaram alguns péptidos possivelmente modificados, após comparação com os espectros das respectivas proteínas nativas. Numa análise mais detalhada, verificou-se que os péptidos LKCASLQK da HSA, LHVDPENFR da Hb- β , GHGKK da Hb- α e FDKFK da hhMb apresentavam uma fragmentação compatível com uma modificação por NADA (Tabela II.40).

Tabela II.40 - Sequências peptídicas e resíduos modificados com NADA.

Ensaio	Massa_{obs} (Da)	Sequência	Resíduo modificado
HSA-B	1085,8	LKCASLQK (198-205)	Q204
Hb-A	1320,6	LHVDPENFR (96-104; Hb- β)	H97
Hb-B	720,5	GHGKK (57-61; Hb- α)	H58
hhMb-A	1071,6	FDKFK (43-47)	F43 ou D44 e K45

O péptido LKCASLQK (198-205) modificado com NADA no resíduo de Gln204, foi também identificado por Carini e colaboradores, modificado em resultado de reacção com HNE (49); contudo estes autores verificaram que o aminoácido modificado foi a Lys199, que sofreu ataque nucleófilo *via* adição de Michael e formação de base de Schiff.^{74, 75} É de notar que na HSA, o resíduo de Lys199 é considerado a par da Cys34 um dos locais mais reactivos para a formação de aductos.⁷⁵ Não são claras as razões para a ocorrência de ataque por resíduos tipicamente menos nucleófilos (Gln204), mas não é de excluir que a selectividade seja determinada por factores de orientação do electrófilo na vizinhança dos aminoácidos em causa.

Nas reacções de modificação da Hb identificou-se o péptido LHVDPENFR (96-104; Hb- β), modificado com uma molécula de NADA no resíduo de His97 e o péptido GHGKK (57-61; Hb- α), modificado no resíduo de His 58. Antunes *et al.*, identificaram um péptido de maiores dimensões, englobando o resíduo 96-104, [GTFATLSELHCDKLHVDPENFR (83-104; Hb- β)], modificado com 12-mesiloxi-NVP (51) no resíduo de Ser89.⁷² Também, Moll e colaboradores detectaram modificação do péptido KLHVDPENFR (96-104; Hb- β) com BMO (55), embora não tenham identificado explicitamente o aminoácido modificado.⁸² Barshteyn *et al.*, caracterizaram o péptido GHGKK (57-61; Hb- α), modificado nos resíduos de His58 e Lys60 e Lys 61 com HMVK (56), um derivado metabólico do BMO (55). A salientar que a His58 modificada, foi o mesmo resíduo identificado nas reacções de modificação com NADA.⁸⁴

Tanto quanto nos foi possível verificar na literatura sobre reacções de modificação da hhMb com espécies electrófilas, é a primeira vez que o péptido **FDKFK** (43-47) é identificado como alvo de modificação, tendo esta ocorrido nos resíduos de Phe43 ou Asp44 e Lys45.

As análises dos espectros de MALDI-TOF-TOF-MS dos péptidos das proteínas HSA, Hb e hhMb modificadas com NADA, permitiram a identificação de alguns péptidos e resíduos modificados (Tabela II.34). No entanto, o número de péptidos identificados face ao grau de modificação das proteínas revelou-se reduzido (Tabela II.40). Foram posteriormente realizados outros ensaios de modificação das proteínas HSA e Hb utilizando uma menor proporção de NADA/proteína (1:20). O objectivo foi obter um menor grau de modificação da proteína, que não dificultasse a acção da tripsina e consequentemente permitisse a identificação dos péptidos e resíduos modificados.

A modificação da Hb e da hhMb com a DA foi realizada por Diedrich⁸¹ e Nicolis³¹, respectivamente. Contudo, as reacções de modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, são apresentadas pela primeira vez neste trabalho. Os nossos resultados sugerem que a neurotoxicidade associada a estas espécies pode resultar de mecanismos similares envolvendo reacções de proteínas com quinonas.

II.7.5.3 Modificação da HSA, Hb com as CA numa razão CA/proteína 1:20

As proteínas HSA e Hb foram ainda modificadas numa proporção de 1:20. Utilizou-se como electrófilo a NADA (**20**), e investigou-se também os metabolitos do *Ecstasy* MeDA (**38**) e diMEDA (**37**), (Tabela II.41). Segundo a literatura por nós consultada as modificações apresentadas na Tabela II.41 são referidas pela primeira vez.

Tabela II.41 - Massa intacta das proteínas modificadas numa proporção de 1:20 por CA.
(Ensaio: “Proteína-A”) oxidante *mushroom tyrosinase* e (Ensaio: “Proteína-B”) oxidante NaIO₄

razão CA/Proteína 1:20	Taxa de modificação
NADA/HSA-A	6
NADA/HSA-B	11
MeDA/HSA-A	2
diMeDA/HSA-A	2
NADA/Hb-A	2-5 (Hb-β)

Com o objectivo de identificar os a.a. modificados, as proteínas modificadas foram sujeitas a hidrólise enzimática clássica pela acção da tripsina, e obtidos os respectivos espectros de MALDI-TOF-MS. A metodologia realizada para identificação dos aductos peptídicos, foi

semelhante à realizada para os ensaios anteriores (cf. secção II.7.5.2 pág.102). Na Tabela II.42 estão apresentados os possíveis péptidos modificados, que para uma atribuição inequívoca foram sujeitos a fragmentação por MALDI-TOF-TOF-MS. Foram ainda identificados outros iões com razão m/z compatível com a modificação pelas CA, esses iões não constam na Tabela II.42, uma vez que a sua fragmentação revelou tratarem-se de péptidos não modificados; no entanto, estão apresentados na Tabela II.43, juntamente com os fragmentos identificados que permitiram a sua atribuição.

Tabela II.42 - Identificação dos iões com m/z compatível com possíveis aductos peptídicos das proteínas HSA e Hb modificadas com CA.

CA/Proteína	Massa _{obs} (Da)	Massa _{teo} (Da)	Δ massa (Da)	Sequência
NADA/HSA-A	1575,9	1381,5	194,3	CCAAADPHECYAK
	1697,9	1503,9	194,0	AFKAWAVARLSQR
	2563,2	2175,0	388,2	EQLKAVMDDFAAFVEKCCK
	2585,1	2391,3	193,8	AWAVARLSQRFPKAEFAEVS K
	2650,2	2456,2	194,0	NYAEAKDVFLLGMFLYEYARR
NADA/HSA-B	1575,9	1381,5	194,3	CCAAADPHECYAK
MeDA/HSA-A	1639,9	1307,8	332,1	HKPKATKEQLK
	1956,2	1623,9	332,3	HPDYSVVLRLAK
diMeDA/HSA-A	1681,0	1320,5	360,5	ETYGEMADCCAK
	1932,2	1570,7	361,5	ADDKETCFAEEGKK
	1956,3	1776,7	179,6	CCKADDKETCFAEEGK
NADA/Hb-A	1126,7	932,5	194,2	SAVTALWGK

Todos os iões apresentados na Tabela II.42, foram sujeitos a fragmentação, contudo nem todos revelaram fragmentações compatíveis com possíveis aductos peptídicos. A fragmentação dos iões 2563,2, 2585,1 e 2650,2; (ensaio NADA/HSA-A), revelou-se inconclusiva, devido à baixa intensidade dos iões precursores que impossibilitou a obtenção de fragmentos com intensidade significativa. Os espectros de MALDI-TOF-TOF-MS dos restantes iões apresentaram fragmentos concordantes com possíveis aductos peptídicos.

Tabela II.43 - Péptidos não modificados identificados nas reacções de modificação da HSA e Hb com CA e respectiva fragmentação.

CA/Proteína	Massa _{obs/teo} (Da)	Sequência - Iões b/y identificados (m/z)
NADA/HSA-A	1742,9/	HPYFYAPELLFFAK - b ₂ (627,3), b ₉ (1118,6), b ₁₀
	1742,9	(1231,6), b ₁₁ (1378,5), b ₁₂ (1526,0), y ₆ (738,4), y ₈ (964,5), y ₉ (1035,5), y ₁₁ (1346,8), y ₁₂ (1508,7), y ₁₃ (1606,9)
	1899,1/	RHPYFYAPELLFFAK - b ₁ (157,1), b ₇ (935,5), b ₉ (1161,5),
	1898,9	b ₁₁ (1388,2)
	2045,2/	VFDEFKPLVEEPQNLIK - b ₈ (976,5), b ₉ (1075,5), b ₁₀
	2045,1	(1204,6), b ₁₁ (1333,6), b ₁₅ (1785,9), b ₁₆ (1900,0), y ₆ (712,4), y ₇ (841,5), y ₈ (970,5), y ₁₁ (1279,7), y ₁₂ (1407,8), y ₁₃ (1554,8), y ₁₄ (1683,9)
NADA/HSA-B	1899,1/	RHPYFYAPELLFFAK - b ₈ (1033,3), b ₉ (1161,5), b ₁₃
	1898,9	(1682,5), y ₁ (147,1), y ₁₃ (1605,8)
	2045,2/	VFDEFKPLVEEPQNLIK - b ₇ (863,3), b ₁₀ (1205,6), b ₁₅
	2045,1	(1785,9), y ₆ (712,4), y ₇ (841,6), y ₈ (970,5), y ₉ (1069,6), y ₁₁ (1279,7), y ₁₂ (1407,8), y ₁₃ (1554,8)
MeDA/HSA-A	1467,9/	RHPDYSVLLLLR - b ₄ (506,3), b ₁₁ (1293,6), y ₈ (962,5),
	1467,8	y ₁₁ (1311,7)
	2045,2/	VFDEFKPLVEEPQNLIK - b ₂ (247,9), b ₄ (491,2), b ₉
	2045,1	(1075,6), b ₁₀ (1204,6), b ₁₁ (1333,6), b ₁₄ (1672,8), b ₁₆ (1900,4), y ₆ (712,5), y ₇ (841,5), y ₉ (1069,6), y ₁₁ (1279,7), y ₁₂ (1407,8), y ₁₃ (1554,9), y ₁₄ (1683,9)
diMeDA/HSA-A	1311,9/	HPDYSVLLLLR - b ₇ (799,5), y ₆ (711,8), y ₈ (962,5)
	1311,7	
	1468,0/	RHPDYSVLLLLR - b ₄ (506,2), b ₁₁ (1293,7), y ₅ (612,4), y ₆
	1467,8	(712,5), y ₇ (799,7), y ₈ (962,6), y ₁₀ (1174,6), y ₁₁ (1311,7)
	1623,9/	DVFLGMFLYEYAR - b ₃ (362,1), b ₅ (532,2), b ₆ (664,2), b ₇
	1623,8	(810,4), y ₁ (175,1), y ₃ (409,2), y ₄ (537,5), y ₅ (701,3), y ₈ (1093,5), y ₉ (1149,6), y ₁₂ (1508,8)
	1743,1/	HPYFYAPELLFFAK b ₆ (779,3), b ₁₀ (1231,7), b ₁₁ (1380,3),
	1742,9	b ₁₂ (1525,8), y ₉ (1035,6), y ₁₁ (1346,0), y ₁₂ (1508,9)
NADA/Hb-A	2059,2/	FFESFGDLSTPDAMGNPK y ₅ (546,3), y ₇ (716,4), y ₉
	2058,9	(928,5), y ₁₀ (1029,6), y ₁₁ (1116,5), y ₁₂ (1229,7), y ₁₄ (1401,8), y ₁₆ (1636,9)

A modificação do ião com m/z de 1575,9, (ensaio NADA/HSA-A, Tabela II.42), foi atribuída ao péptido CCAAADPHECYAK (314-372), com m/z de 1381,5, compatível com a modificação por uma molécula de NADA. No espectro de MALDI-TOF-TOF-MS do ião com m/z de 1575,9, foi detectado o ião não modificado b_6 (m/z 535,5), e os iões modificados b_9 (m/z 1091,6) y_6 (m/z 957,5), e y_{12} (m/z 1471,6), (Tabela II.44). Pela análise dos iões b identificados, a modificação não ocorreu até ao resíduo de Asp319 (b_6), tendo ocorrido entre os resíduos de Pro320, His321 e Glu322, dado a identificação do ião b_9 . Contudo, a atribuição do ião y_6 modificado, sugere que a modificação no péptido CCAAADPHECYAK (314-372), ocorreu no resíduo de His321.

Relativamente à fragmentação do ião com m/z de 1575,9, mas no ensaio NADA/HSA-B (Tabela II.42), os iões b/y identificados, [b_3 (m/z 278,6), b_{4+NADA} (m/z 542,3), b_6 (m/z 535,5), b_{11} (m/z 1165,7), y_1 (m/z 147,4), y_6 (m/z 763,8), e y_7 (m/z 847,9), (Tabela II.44)], confirmaram a modificação do péptido CCAAADPHECYAK (314-372), mas não permitiram atribuição do local de modificação, uma vez que a informação retirada é inconclusiva. Ou seja, os iões b não modificados sugerem que a modificação ocorreu no resíduo de Ala371 ou Lys372, não compatível com a identificação do ião b_4 modificado, que sugere que a modificação ocorreu até ao resíduo de Ala317, e também não compatível com os iões y identificados (y_1 , y_6 , y_7), que sugerem que a modificação ocorreu entre os resíduos de Cys 314, Cys 315 e Glu 319.

Ainda no ensaio NADA/HSA-A (Tabela II.42), mas relativamente ao ião com m/z de 1697,9, compatível com a modificação do péptido AFKAWAVARLSQR (210-222) com uma molécula de NADA, foi possível identificar no espectro de MALDI-TOF-TOF-MS, os fragmentos não modificados b_3 (m/z 347,7), b_5 (m/z 605,8), y_1 (m/z 175,1), y_3 (m/z 309,8), e os fragmentos modificados b_7 (m/z 966,5), e b_8 (m/z 1039,9). A identificação do ião não modificado b_5 (Trp214), e do ião modificado b_7 (Val216), sugere que a modificação ocorreu no resíduo de Val216, [AFKAWAVARLSQR (210-222)], uma vez que o a.a. anterior não é nucleófilo, (Ala215).

Em relação à reacção da HSA com MeDA, foram identificados como potenciais aductos peptídicos os iões com m/z de 1639,9 e 1956,2 (Tabela II.42). O ião com m/z de 1639,9 é compatível com o incremento de duas moléculas de NADA no péptido HKPKATKEQLK (338-351), porém como no espectro de MS/MS o único fragmento identificado foi o ião não modificado y_7 (m/z 817,4), não foi considerado como aducto modificado.

Ainda em relação ao ensaio MeDA/HSA-A, no espectro de MALDI-TOF-TOF-MS (Figura II.37), do ião com valor de m/z de 1956,2 compatível com a modificação do péptido HPDYSVLLLLRLAK (338-351) por duas moléculas de MeDA, foram detectados os fragmentos não modificados y_1 (m/z 147,2), y_8 (m/z 925,8) e os fragmentos modificados com duas moléculas de electrófilo b_{13} (m/z 1809,2) e y_{12} (m/z 1721,7). Os iões identificados indicam

que a modificação ocorreu entre o fragmento y_8 e y_{12} , ou seja, entre os resíduos de Asp340, Tyr341, Ser342, Val343. No entanto, não temos qualquer evidência em qual destes resíduos ocorreu a modificação.

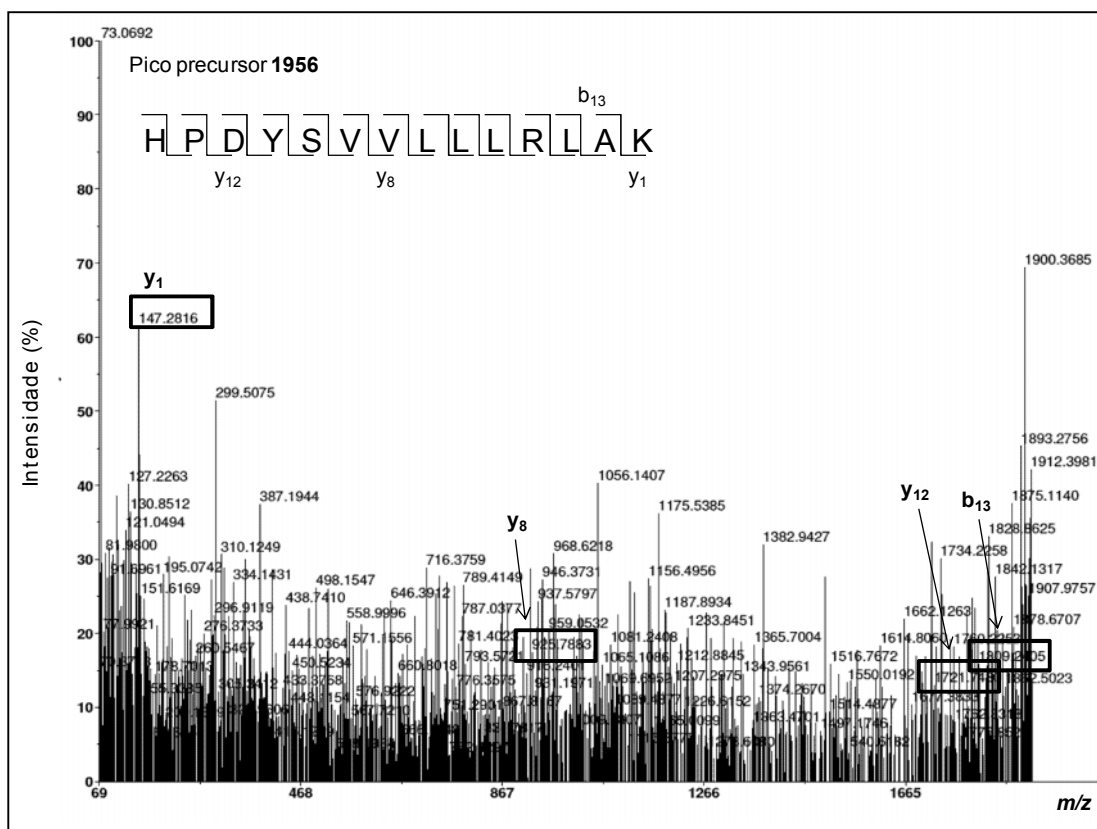


Figura II.37 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA, HPDYSVLLRLAK, modificado com MeDA, e identificação dos fragmentos peptídicos.

Na reacção da HSA com diMeDA, foram identificados como potenciais aductos os iões com razão m/z de 1681,0, 1932,2 e 1956,3 (Tabela II.42), que podem corresponder à modificação dos péptidos ETYGEMADCCAK (106-117), ADDKETCFAEEGKK (561-574) e CCKADDKETCFAEEGK (588-573), respectivamente.

No espectro de MS/MS do ião com m/z de 1681,0, compatível com a modificação do péptido ETYGEMADCCAK (106-117), por duas moléculas de diMeDA, foram atribuídos os iões não modificados y_1 (m/z 147,3), y_4 (m/z 423,0), y_5 (m/z 538,4), y_6 (m/z 608,3), (Tabela II.44), que apontam para a modificação do péptido, mas nada informam sobre os resíduos alterados, insuficiente para atribuir a modificação por duas moléculas de diMeDA ao péptido ETYGEMADCCAK.

Em relação ao ião com m/z de 1932,2, (diMeDA/HSA-A), compatível com a modificação do péptido ADDKETCFAEEGKK (561-574) por duas moléculas de diMeDA, foram detectados no espectro de MS/MS os iões não modificados b_6 (m/z 660,4), y_1 (m/z 147,3) e y_3 (m/z

331,6) e os iões modificados b_7 (m/z 942,4) e b_8 (m/z 1269,4). Os iões b identificados apontam para uma modificação com diMeDA nos resíduos de Cys567 e Phe568 do péptido ADDKET**C**FAEEGKK (561-574).

Foi ainda sujeito a fragmentação o ião com m/z de 1956,3 (Figura II.38), compatível com a modificação do péptido CCKADDKET**C**FAEEGK (588-573), por diMeDA. Foram identificados os iões não modificados b_2 (m/z 207,5), b_3 (m/z 335,6), y_7 (m/z 783,7) e os iões modificados b_9 (m/z 1174,3), b_{15} (m/z 1809,8), y_{10} (m/z 1318,7) e y_{13} (m/z 1621,6), que permitiram a atribuição da modificação no resíduo de Lys 594 no péptido CCKADDKET**C**FAEEGK.

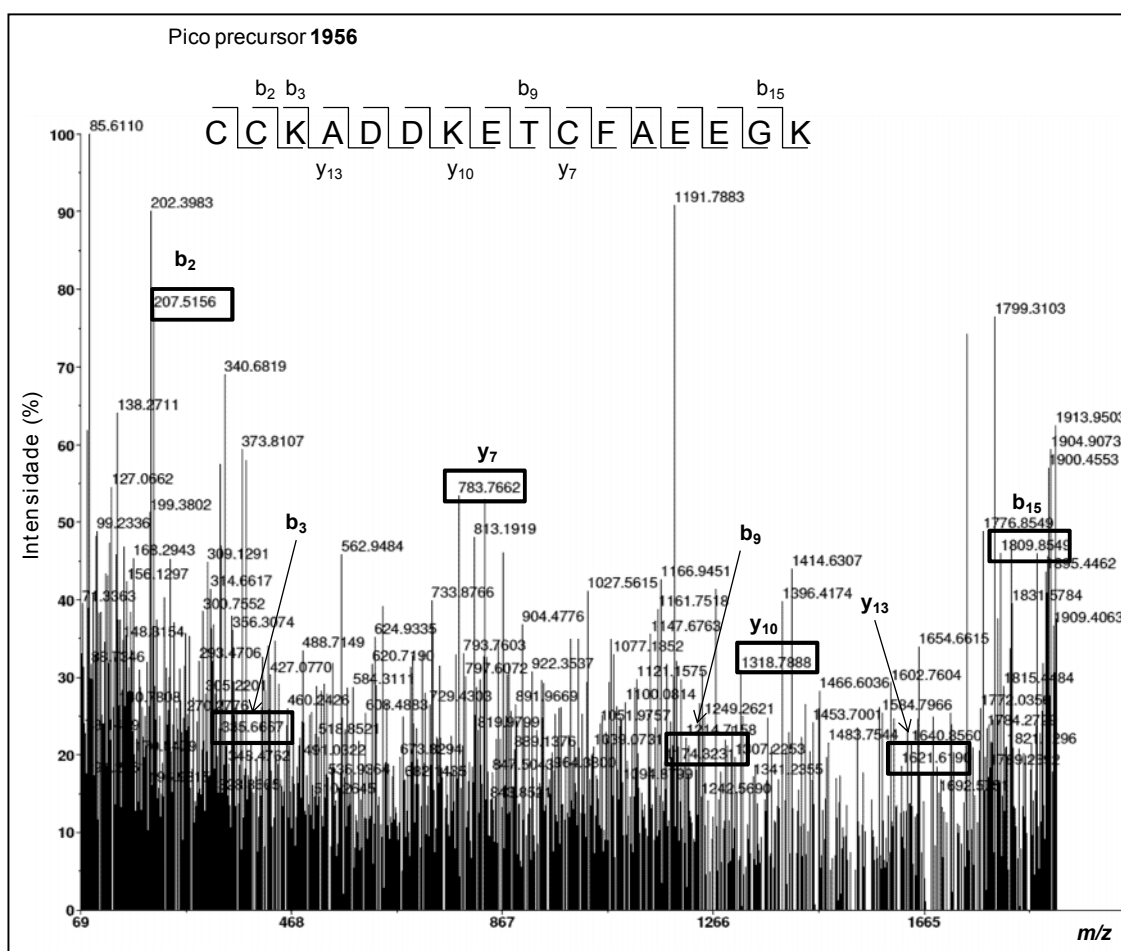


Figura II.38 - Espectro de MS/MS do péptido da HSA, CCKADDKETCF AEEGK, modificado com diMeDA, e identificação dos fragmentos peptídicos.

Na reacção de modificação da Hb, foi identificado o ião com m/z de 1126,7, como possível aducto peptídico. A modificação por uma molécula de NADA foi atribuída ao péptido SAVTALWVGK (9-17; Hb- β). Realizou-se a fragmentação do ião por MALDI-TOF-TOF-MS e foram atribuídos os iões modificados b_8 (m/z 978,8), y_6 (m/z 807,9), que sugerem que a modificação ocorreu entre os resíduos de Thr12, Ala13, Leu14, Trp15 e Gly16. Atendendo à nucleófilicidade dos supostos resíduos modificados acreditamos ser o Trp15, o possível

local de modificação. Apesar do exposto, o ião com m/z de 1126,7, pode corresponder a um péptido não modificado, com a mesma razão m/z , o péptido LHVDPENFR (96-104; Hb- β). Deste modo, os iões b/y do péptido LHVDPENFR foram analisados, sendo identificados os iões b_3 (m/z 350,2) e y_5 (m/z 662,3), este último com uma intensidade significativa. Face ao exposto a modificação do péptido SAVTALWGK por uma molécula de NADA é encarada com reserva.

Tabela II.44 - Sequências peptídicas e resíduos modificados com NADA, MeDA e diMeDA.
Iões b/y identificados.

Proteína/CA	Massa _{obs} (Da)	Sequência - Resíduo modificado I Iões b/y identificados
HSA/ NADA-A	1575,9	CCAAADPHECYAK (314-372) - H321 - b_6 (535,5), b_{9+NADA} (1091,6), y_{6+NADA} (957,5), $y_{12+NADA}$ (1471,6)
	1697,9	AFKAWAVARLSQR (210-222) - V216 - b_3 (347,7), b_5 (605,8), b_{7+NADA} (966,5), b_{8+NADA} (1039,9), y_1 (175,1), y_3 (309,8)
HSA/NADA-B	1575,9	CCAAADPHECYAK (314-372) - b_3 (278,6), b_{4+NADA} (542,3), b_6 (535,5), b_{11} (1165,7), y_1 (147,4), y_6 (763,8), y_7 (847,9)
HSA/MeDA-A	1956,2	HPDYSVLLLLRLAK (338-351) - D340 e/ou Y341 e/ou S342 e/ou V343 - $b_{13+2 \times diMeDA}$ (1809,2), y_1 (147,2), y_8 (925,8), $y_{12+2 \times diMeDA}$ (1721,7)
HSA/diMeDA-A	1932,2	ADDKETCFAEEGKK (561-574) - C567 e F568 - b_6 (660,4), $b_{7+diMeDA}$ (942,4), $b_{8+2 \times diMeDA}$ (1269,4), y_1 (147,3), y_3 (331,6)
	1956,3	CCKADDKETCFAEEGK (588-573) - K594 - b_2 (207,5), b_3 (335,6), $b_{9+diMeDA}$ (1174,3), $b_{15+diMeDA}$ (1809,8), y_7 (783,7), $y_{10+diMeDA}$ (1318,7), $y_{13+diMeDA}$ (1621,6)
Hb/NADA-A	1126,7	SAVTALWGK (9-17) b_8 (m/z 978,8), y_6 (m/z 807,9),

Na literatura por nós consultada sobre reacções de modificação da HSA com espécies electrófilas, os péptidos CCAAADPHECYAK (314-372), ADDKETCFAEEGKK (561-574) e CCKADDKETCFAEEGK (588-573) não foram identificados como alvos de modificação. Assim sendo, acreditamos ser a primeira vez que estes péptidos são apresentados como alvos modificados.

Nas reacções de modificação da HSA com NADA identificou-se o péptido AFKAWAVARLSQR (210-222), modificado no resíduo de Val216. Na literatura encontrou-se dois exemplos da modificação de péptidos de menores dimensões que englobam o péptido AFKAWAVARLSQR (210-222). Alvarez-Sánchez *et al.*, identificaram o péptido AFKAWA-

VAR (210-220), modificado no resíduo de Lys212 pelo composto 5-[^{13}C]-5-cloro-2-metilisotiazol-3-ona (**100**),¹²⁹ e Antunes *et al.*, identificaram o péptido AWAVAR (213-218), modificado com 12-mesiloxi-NVP no resíduo de Trp214.

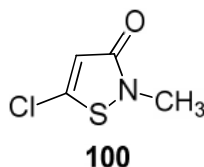


Figura II.39 - Representação da estrutura do composto **100**.¹²⁹

O péptido HPDYSVLLLLRLAK (338-351) modificado com MeDA entre os resíduos de D340 e V343, foi também identificado modificado por Alvarez-Sánchez *et al.* e Antunes *et al.*, mas neste caso englobado no péptido RHPDYSVLLLLR (337-349). Esta modificação ocorreu no resíduo de His338 por MCI e 12-mesiloxi-NVP.^{72, 129}

Na reacção de modificação da Hb com NADA, foi identificado o péptido SAVTALWGK (9-17), como possível aducto. Kristiansson e colaboradores, identificaram dois péptidos de maiores dimensões [VHLTPEEKSAVTALWGK (1-17) e SAVTALWGKVNVDDEVGGEALGR (9-30)], que abrangem o péptido por nós identificado modificados com HHPA (**59**), no resíduo de Val1 e Lys17, respectivamente.⁸³

II.7.5.4 Em Resumo:

- Nas reacções de modificação das proteínas com CA, numa razão CA/proteína 1:2 e 1:20, identificaram-se os potenciais péptidos mono e di-modificados.
- No espectro de MALDI-TOF-TOF-MS do péptido não modificado da HSA, DDNPNLPR, identificaram-se vários fragmentos com intensidade significativa, que permitiram confirmar a operacionalidade das condições de fragmentação.
- Na maioria dos possíveis péptidos modificados os espectros de MS/MS apresentaram padrões de fragmentação inconclusivos, possivelmente devido à baixa intensidade dos péptidos modificados.

- Na modificação das proteínas numa proporção NADA/proteína de 1:2, foram identificados os péptidos modificados LK**CASLQK** (198-205) da HSA, no resíduo de Gln204; LHVD**PENFR** (96-104) da Hb- β , no resíduo de His 97; **GHGKK** (57-61) da Hb- α no resíduo de His58 e **FDKFK** (43-47) da hhMb nos resíduos de Phe43 ou Asp44 e Lys45.

- Na modificação das proteínas numa proporção CA/proteína de 1:2, foram identificados os péptidos modificados da HSA com NADA, CCAAAD**PHECYAK** (314-372) no resíduo de H321, e AFKAWA**VARLSQR** (210-222) no resíduo de V216; o péptido modificado da HSA com MeDA HP**DYSV**LLLLRLAK (338-351) nos resíduos de D340 e/ou Y341 e/ou S342 e/ou V343; e os péptidos modificados da HSA com diMeDA, ADDKET**CFAEEGKK** (561-574) nos resíduos de C567 e F568 e CCKADD**KETCFAEEGK** (588-573) no resíduo de K594. Foi ainda identificado o possível péptido modificado da Hb com NADA, SAVTALWGK (9-17; Hb- β).

II.7.6 Identificação dos aminoácidos modificados por LC-ESI-MS/MS

Nas reacções de modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, para identificação dos a.a. modificados, realizou-se a hidrólise enzimática aos a.a., com pronase E e LAP, seguida de análise por LC-ESI-MS/MS. Esperava-se que a comparação do tempo de retenção e da razão m/z , dos padrões 5-Cys-NADA (**76**) e 6-His-NADA (**88**) (Figura II.40 e Figura II.41), previamente sintetizados no nosso laboratório e bem caracterizados por RMN e MS, com o dos aductos de proteínas, fosse determinante para a identificação dos resíduos de a.a. modificados e regioselectividade da modificação.

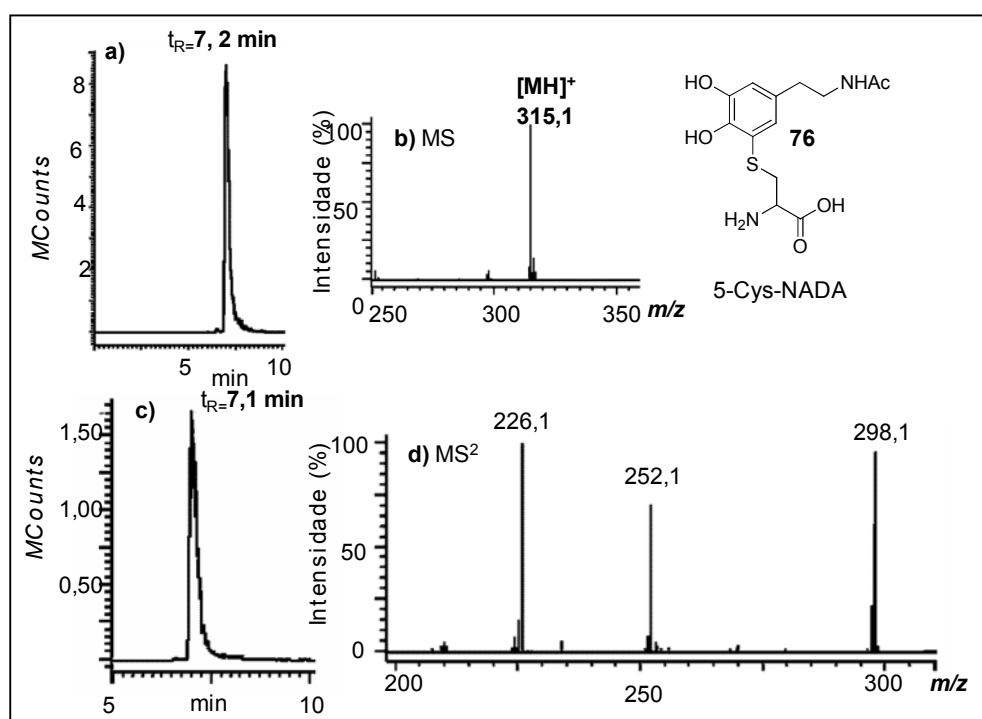
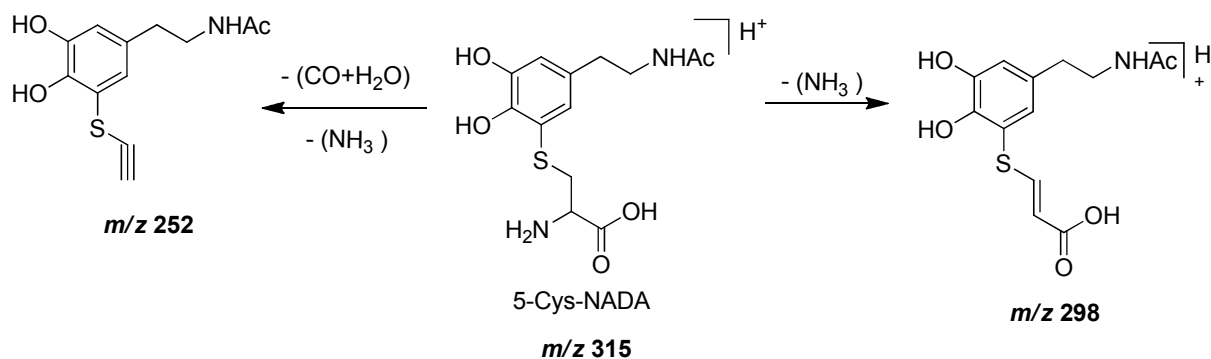


Figura II.40 – (a) Cromatograma iónico extraído para o ião com m/z 315, e respectivo espectro de massa, (b). LC-ESI-MS/MS do ião 315 (m/z), cromatograma iónico (c) e MS², (d).

Para caracterização da fragmentação do aducto 5-Cys-NADA (**76**), realizou-se o espectro de MS², e observou-se três picos maioritários a m/z 298; 252 e 226. As estruturas propostas para os iões a m/z 298; 252 estão apresentadas na Esquema II.11. Nos iões identificados verificou-se ser mais susceptível a sofrer fragmentação, o resíduo de a.a.. Tanto quanto nos foi possível verificar na literatura é a primeira vez que a fragmentação do composto **76** é interpretada.



Esquema II.11 – Estruturas propostas para os iões fragmentos do aducto protonado da 5-Cys-NADA (**76**), a $m/z\ 315$.

Para melhor explicar o padrão de fragmentação do composto 6-His-NADA (**88**), foi necessário recorrer à espectrometria de massa tandem (Figura II.41). No MS foi identificado o ião maioritário, que corresponde ao aducto protonado, $[MH]^+$, a $m/z\ 349$, e os iões a $m/z\ 307$ e 303 , cujas estruturas propostas estão representadas no Esquema II.12. No MS^2 obtivemos como ião maioritário, o pico a $m/z\ 303$, que ao sofrer fragmentação deu origem aos iões com $m/z\ 286$, 262 e 244 , cujas estruturas propostas encontram-se no Esquema II.12.

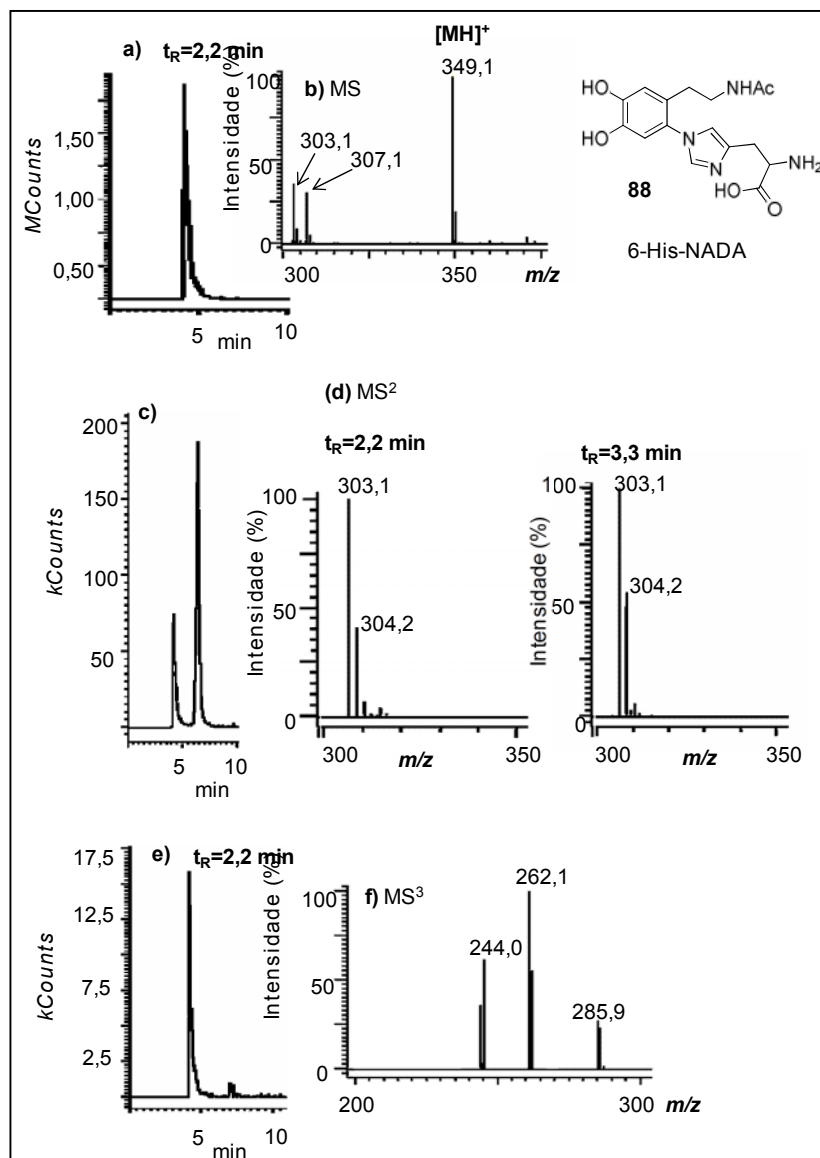
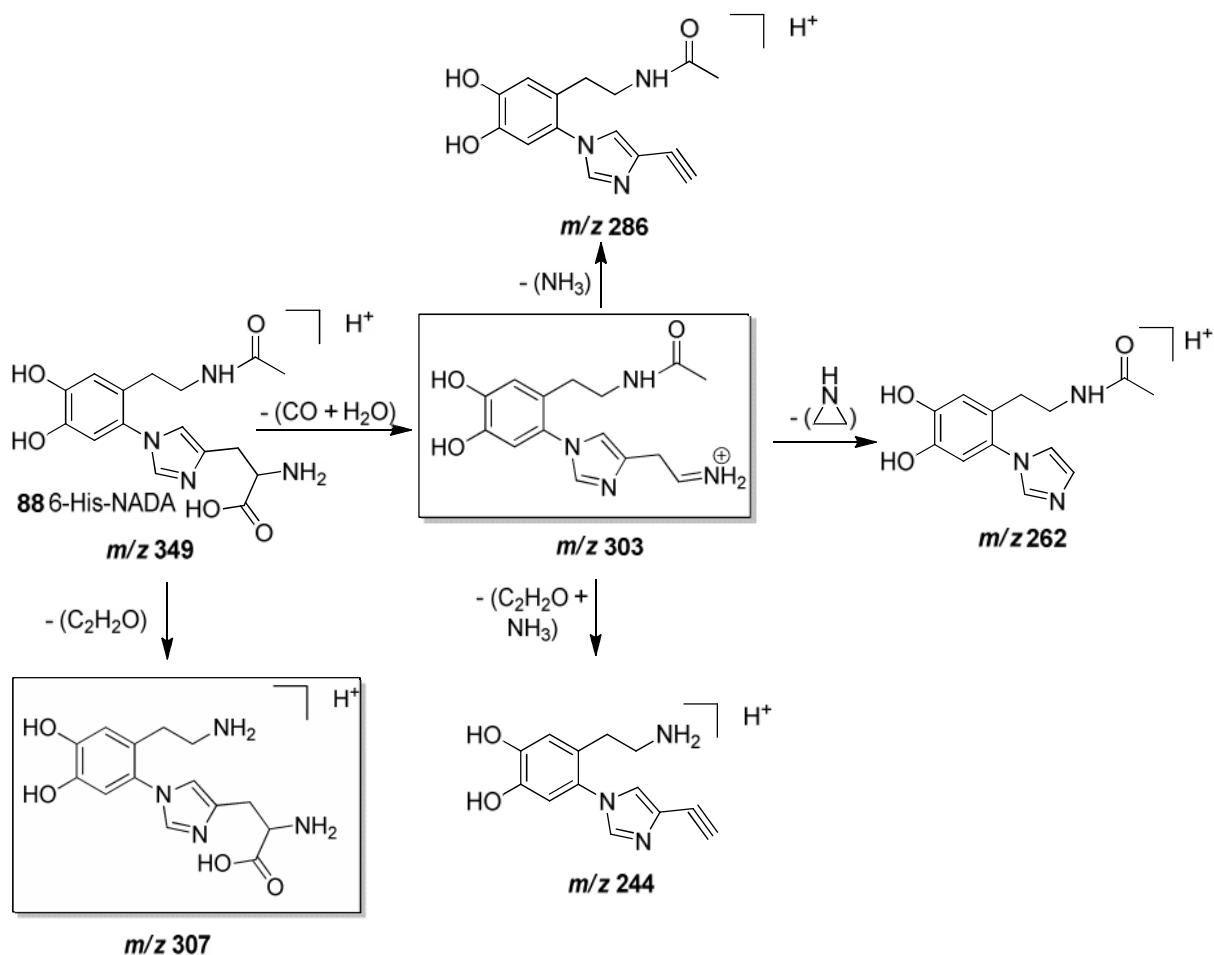


Figura II.41 - (a) Cromatograma iônico extraído para o íon a m/z 349 e respectivo espectro de massa, (b). Espectro de LC-ESI-MS/MS do íon 349 (m/z), cromatograma iônico (c), e espectro de massa, (d). Espectro de LC-ESI-MS/MS/MS do íon 349 (m/z), cromatograma iônico (e), e respectivo espectro de massa, (f).



Esquema II.12 - Representação esquemática da fragmentação proposta para o aducto protonado 6-His-NADA (88), a m/z 349.

Kerwin *et al.*, analisaram por ESI-MS aductos de catecóis com a His, entre eles as moléculas 6-NACHis-NADA e 6-His-DA, tendo verificado que o fragmento mais intenso, em ambos os compostos, corresponde à descarboxilação relativamente ao pico precursor.¹³⁰ Nos fragmentos por nós identificados, dos aductos 5-Cys-NADA e 6-His-NADA, a descarboxilação foi consistentemente observada, mas foram detectados outros modos de fragmentação característicos, que podem ser explicados pelas diferentes condições experimentais para a obtenção dos espectros de massa.

Realizamos também a fragmentação da NADA (Figura II.42), com o objectivo de identificar os fragmentos característicos da estrutura catecólica que pudessem ser reconhecidos nos possíveis aductos. Nos cromatogramas iónicos totais (Figura II.42a e b), observam-se dois picos, que correspondem ao aducto da NADA protonado em diferentes locais.

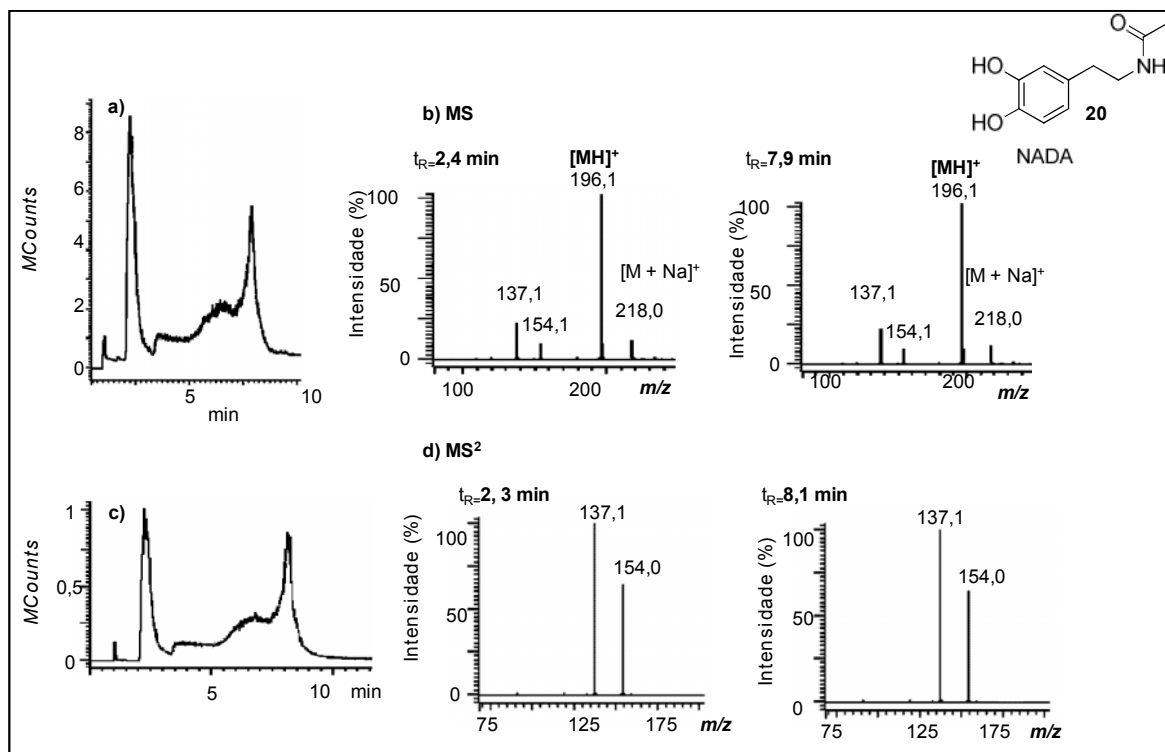
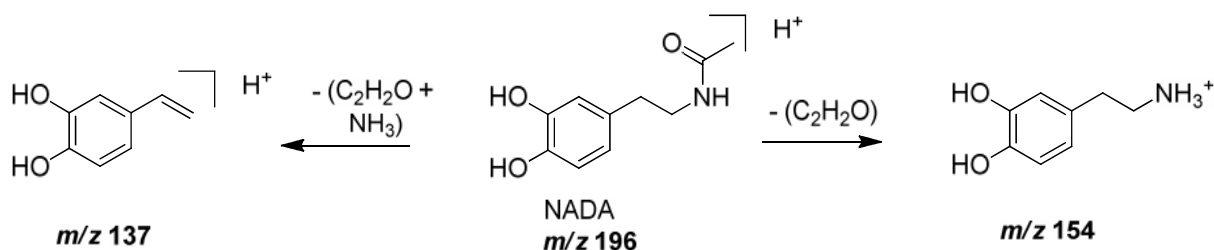


Figura II.42 - (a) Cromatograma iônico total do composto NADA e respectivos espectros de massa, (b). Espectro de LC-ESI-MS/MS do íon 196 (m/z), (c) Cromatograma iônico total e respectivos espectros de massa, (d).

No MS foram identificados para além da molécula protonada, a m/z de 196, os iões a m/z 154 e 137, consistentes com as estruturas indicadas no Esquema II.13, tal como anteriormente proposto por Kerwin.¹³¹ No espectro de MS² podemos observar novamente os fragmentos a m/z 154 e 137, mas com uma intensidade bastante significativa, o que indica que derivam da molécula protonada.



Esquema II.13 - Representação esquemática da fragmentação do composto NADA, a m/z 196, [MH]⁺.

II.7.6.1 Modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2

As proteínas HSA, Hb e hhMb foram modificadas com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, sendo a quinona, gerada com *mushroom tyrosinase* (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO_4 (Ensaio: “Proteína-B”) Tabela II.45. Realizou-se a hidrólise aos a.a., segundo o procedimento descrito por Antunes *et al.*,⁷² e as amostras foram analisadas por LC-ESI-MS.

Tabela II.45 - Reacções de modificação da HSA, Hb e hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, usando como oxidante *mushroom tyrosinase* (Ensaio: “Proteína-A”) ou NaIO_4 (Ensaio: “Proteína-B”), seguidas de hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP.

razão NADA/Proteína 1:2	Tratamento da amostra
HSA-A	filtros de crivagem
HSA-B	24 h de diálise
HSA-B	48 h de diálise
HSA-B	filtros de crivagem
Hb-A	Apoproteína
Hb-B	Apoproteína
hhMb-A	Apoproteína
hhMb-B	Apoproteína

Após as incubações da HSA com NADA, foram realizados diferentes tratamentos às amostras, filtração ou diálise em 24 h ou 48 h (Tabela II.45), e foram obtidos os espectros de LC-ESI-MS. Esses espectros (Figura II.43), revelaram-se praticamente idênticos, tendo-se verificado que tanto a diálise como a filtração, são excelentes procedimentos para recolher os compostos de maior peso molecular. Contudo, como a diálise é um processo bastante demorado optou-se pela realização da filtração em ensaios subsequentes.

No cromatograma iónico total do ensaio HSA-A (Figura II.43), observam-se alguns iões com razão m/z típica de aminoácidos não modificados, com é o caso da arginina Arg (132 m/z), da Phe (166 m/z), e da Cys (122 m/z). Foram ainda detectados iões com razão m/z na ordem dos 500 e 600 m/z , que podem corresponder a péptidos que não foram completamente hidrolisados.

Anteriormente (cf. secção II.7.4.1, pág. 91), verificámos que numa razão NADA/HSA de 1:2, a HSA sofreu elevada modificação, 32 resíduos no ensaio HSA-A e 54 no ensaio HSA-B

(tratamento da amostra, filtração (Tabela II.45), que provavelmente condicionou a acção da tripsina, resultando numa hidrólise menos eficiente. Ao analisarmos os resultados da hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP, observamos uma vez mais que a digestão não foi eficaz. Supomos que não se trata de um problema de actividade das próprias enzimas, já que o mesmo procedimento de hidrólise aos a.a. foi efectuado com sucesso em diversos trabalhos de investigação desenvolvidos no nosso laboratório.⁷² Julgamos que a acção das enzimas pode ter sido limitada pela elevada modificação da proteína, que muito provavelmente alterou a sua estrutura tridimensional, impedindo que as enzimas reconhecessem os resíduos de corte. Adicionalmente a susceptibilidade dos resíduos de a.a. modificados com NADA a reacções de oxidação, pode ter levado a reacções intramoleculares com formação de cross-link.

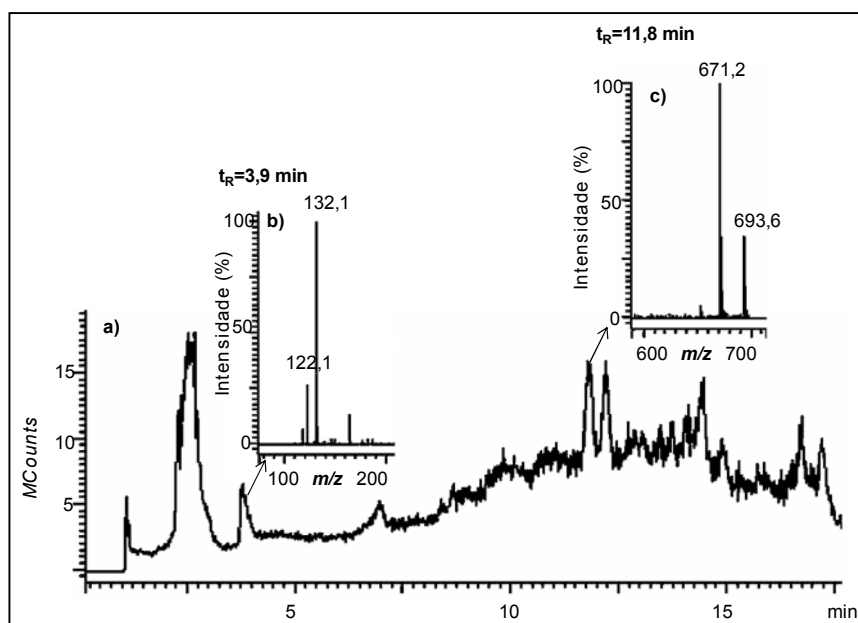


Figura II.43 - (a) Cromatograma iónico total (LC-ESI-MS) entre os 0-17,5 min, da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:2 (HSA-A, filtros de crivagem), obtido após hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP. (b) e (c) Representação dos espectros de massa a t_R de 3,9 min e 11,8 min, respectivamente.

Relativamente à hhMb, foram identificados alguns possíveis aductos. No ensaio hhMb-A, foi identificado com t_R de 1,4 min o pico a m/z 327, que pode corresponder à adição de uma molécula de NADA ao ácido aspártico (Asp), (Figura II.44c). Neste ensaio e no hhMb-B, foram ainda atribuídos, com t_R reproduzível, os picos 269, 283 e 311, que podem corresponder aos aductos da NADA protonados com a glicina (Gly), a alanina (Ala), a valina (Val) e o Asp, respectivamente. No entanto, só a Gly terminal e o Asp através do ácido carboxílico da cadeia lateral, têm características consistentes com a modificação da proteína intacta. A

modificação nos resíduos de Ala e Val não é possível na proteína intacta, pelo que, este resultado é encarado com reserva. Saliente-se aliás que a intensidade dos picos é bastante baixa, impedindo uma fragmentação dos mesmos e consequentemente uma atribuição inequívoca.

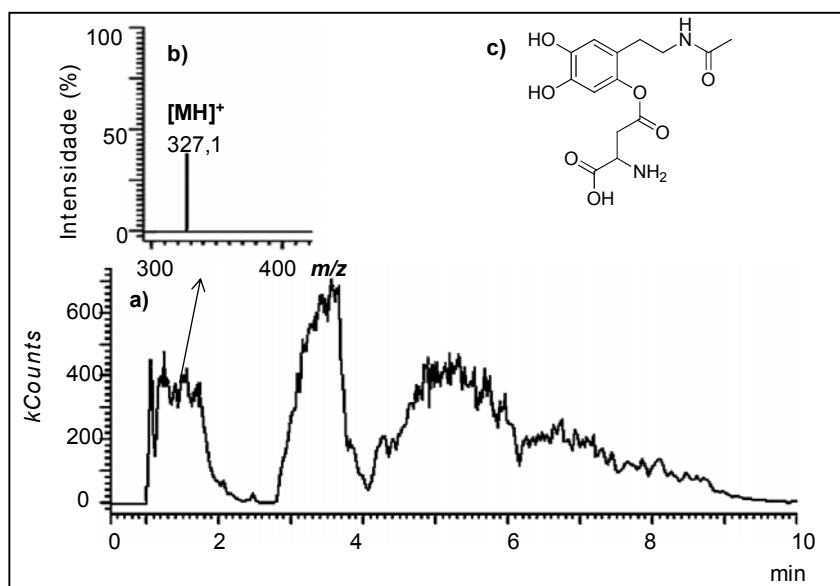
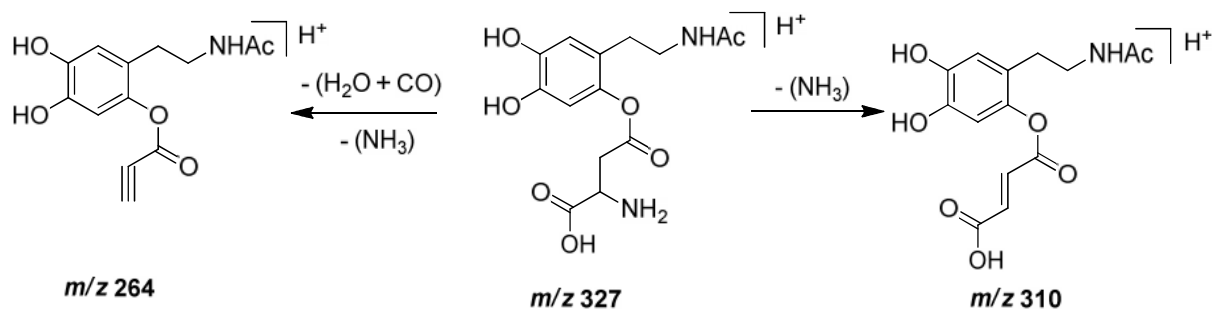


Figura II.44 - (a) Cromatograma iónico total, da reacção da hhMb com NADA numa proporção de 1:2 (hhMb-A), hidrolisada aos a.a. com pronase E e LAP. (b) Espectro de ESI-MS do possível aducto da NADA com o Asp, e respectiva estrutura proposta (c).

No entanto, realizou-se a fragmentação do ião a m/z 327, (ensaio hhMb-A) e identificou-se os fragmentos a m/z 310 e de 264, cujas estruturas propostas se encontra no Esquema II.14. O padrão de fragmentação identificado é compatível com a modificação do resíduo de Asp, pelo que pensamos estar perante o respectivo aducto. Na estrutura sugerida para o aducto, assumimos que a regioselectividade do ataque nucleófilo do Asp à molécula de NADA, ocorreu na posição 6 do anel aromático, uma vez que este é o carbono mais electrófilico. Foi ainda efectuada a fragmentação do ião a m/z 327, (ensaio hhMb-B) e o resultado revelou-se reproduzível com o exposto acima. Assim sendo, independentemente do oxidante utilizado; *mushroom tyrosinase*, (ensaio A) ou NaIO_4 (ensaio B) acreditamos ter identificado o aducto da NADA com a hhMb no resíduo de Asp.



Esquema II.14 - Representação esquemática do possível aducto da NADA com o Asp, com $[MH]^+$ $m/z\ 327$, e respectivo fragmento a $m/z\ 310$ e 264 .

Com o objectivo de obter uma digestão mais eficiente, que nos permitisse identificar um número mais elevado de possíveis aductos, foi testado o procedimento de hidrólise descrito por Waidyanatha *et al.*,⁷⁷ (cf. secção III.17.2.2, pág. 192), e obtido o respectivo espectro de LC-ESI-MS. Assim sendo, no ensaio hhMb-A foi identificado o ião a $m/z\ 327$, o possível aducto da NADA com o Asp, e o ião a $m/z\ 283$, compatível com a modificação da Ala com NADA. Este resultado é reproduzível com o observado no LC-ESI-MS obtido após a hidrólise segundo Antunes *et al.*⁷² Ambos os iões foram sujeitos a fragmentação. No MS^2 do ião do provável aducto da NADA com o Asp, foi identificado o fragmento a $m/z\ 310$, cuja estrutura proposta encontra-se no Esquema II.14 e reproduzível com o observado anteriormente. Relativamente ao MS^2 do possível aducto com a Ala (ião a $m/z\ 283$), foi identificado o ião a $m/z\ 265$ que corresponde à perda de água em relação ao ião precursor ($m/z\ 283$) (Esquema II.16). A fragmentação do ião a $m/z\ 283$ será discutida com mais pormenor na secção II.7.6.2, pág. 132. Através da fragmentação dos iões a $m/z\ 327$ e 283 , foi possível identificar os aductos da hhMb modificada com NADA nos resíduos de Asp e Ala.

A referir ainda que, na modificação da hhMb com NADA (razão NADA/hhMb de 1:2-A), foi identificado após digestão com tripsina e análise por MALDI-TOF-TOF-MS, (cf. secção II.7.5.2, pág. 102), o resíduo de Asp44 muito provavelmente modificado. No entanto, no caso da identificação por LC-ESI-MS não é possível identificar qual dos 8 resíduos de Asp da hhMb está modificado (Figura II.45).

```

1 MGLSDGEWQQ VLNVWGKVEADIAGHGQEV LRLFTGHPET LEKFDKFKHL
51 KTEAEMKASE DLKKHGT VVL TALGGILKKK GHHEAELKPLAQSHATKHKI
101 PIKYLEFISD AIIHVLH SKH PGDFGADAQG AMTKALELFR NDIAAKYKEL
151 GFQG
  
```

Figura II.45 - Sequência da hhMb, com os resíduos de Asp (D) a negrito.

Das incubações da Hb com NADA (Hb-A e B), após digestão aos a.a. e análise por LC-ESI-MS, foi atribuído com t_R de ca. de 1,5 min o pico a $m/z\ 269$ e 327 , que parece corres-

ponder aos aductos da NADA protonados, com a Gly e o Asp, respectivamente, que terão coeluido. No entanto, como acima referido só o Asp através do ácido carboxílico da cadeia lateral, tem características para modificar a proteína intacta. Além disso, nesta proteína os resíduos terminais correspondem a uma Val e a uma His, pelo que a modificação da Gly não é expectável na proteína intacta. Realizou-se a fragmentação dos picos a m/z 269, e 327 (Figura II.46), no ensaio Hb-B. A análise do espectro de MS/MS do ião a m/z 327 (Figura II.46), revelou que possivelmente estamos perante o aducto da NADA com o Asp, uma vez que foram identificados os fragmentos a m/z 222 e 205, cujas estruturas propostas são compatíveis com a modificação em estudo (Esquema II.15). Como o ião seleccionado (m/z 327) era pouco abundante obteve-se um espectro de iões produto com picos pouco abundantes.

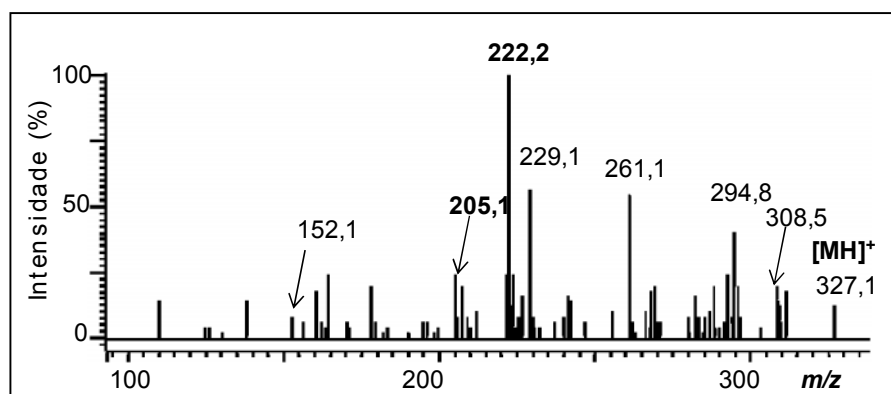
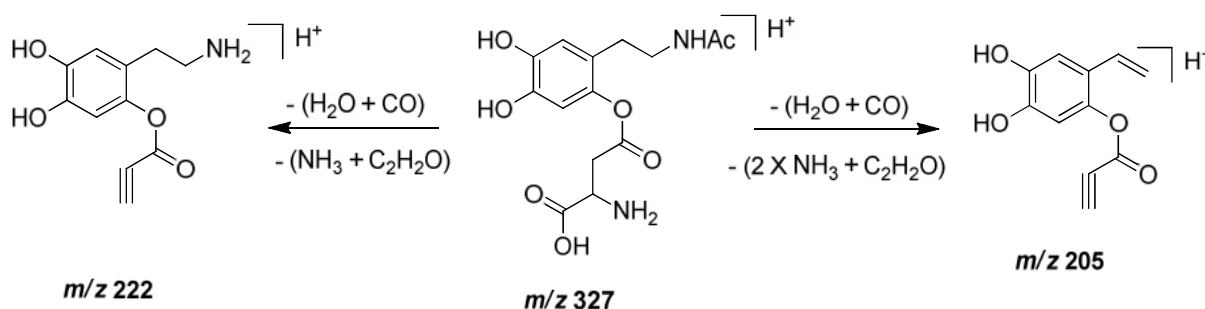


Figura II.46 - Espectro de LC-ESI-MS/MS do ião 327 (m/z). Os iões identificados no espectro de MS/MS encontram-se a negrito.



Esquema II.15 - Representação esquemática da fragmentação do aducto da NADA com o Asp, com $[MH]^+$ a m/z 327.

No ensaio Hb-A, realizou-se igualmente a fragmentação do ião a m/z 327, que corresponde ao aducto da NADA com o Asp. Obteve-se como fragmento maioritário, o ião a m/z 222 (Esquema II.15), à semelhança do observado no padrão de fragmentação do aducto no ensaio Hb-B.

Esta abordagem para identificação dos a.a. modificados, não nos permite identificar a localização do resíduo modificado na sequência peptídica. Como a Hb possui 7 resíduos de Asp, o Asp 21, 47, 52, 73, 79, 94, 99 (Figura II.47), não sabemos qual destes resíduos foi modificado com NADA.

1 MVHLTPEEKS AVTALWGKVN V DEVGGEALG RLLVVYPWTQRFFESFG D LS 51 TP D AVMGNPK VKAHGKKVLG AF S DGLAHL D NLKGTfATLS ELHC D KLHVD 101 PENFRLLGNV LVCVLAHHFG KEFTPPVQAA YQKV V AGVAN ALAHKYH
--

Figura II.47 - Sequência da Hb, com os resíduos de Asp (D) a negrito.

De referir ainda que os iões fragmentos identificados do possível aducto do ácido aspártico, nos ensaios Hb-A e B (Esquema II.15) e hhMb-A e B (Esquema II.14) não são reproduzíveis. Muito provavelmente porque as condições de fragmentação não foram semelhantes.

Ao analisarmos o espectro de MS/MS do ião a m/z 269, (Hb-A), foi possível identificar o ião a m/z 251, que corresponde à perda de água. Dado, este ião ter sido o único fragmento identificado, parece-nos insuficiente atribuir de forma inequívoca o ião a m/z 269 ao aducto da NADA, com a Gly, além disso, parecíamos muito improvável a modificação deste resíduo na proteína intacta.

II.7.6.2 Modificação da HSA e Hb, numa razão CA/proteína 1:20

A HSA foi incubada na presença de NADA, numa proporção NADA/HSA de 1:20, tendo-se utilizado *mushroom tyrosinase* como agente oxidante. Pela análise de massa intacta, verificou-se que 6 resíduos de a.a. foram modificados. De modo a identificar os resíduos modificados, realizou-se a hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP,⁷² seguida de análise por LC-ESI-MS. No cromatograma iónico total obtido (Figura II.48), foi detectado um potencial a.a. modificado com NADA, a Ala, a t_R de 13,1 min, a m/z 283. Como referido anteriormente a modificação da Ala por NADA na proteína intacta é encarada com reserva, dado na HSA este resíduo não ser terminal. No entanto, para que não restem dúvidas relativamente à atribuição deste ião, realizou-se fragmentação do mesmo.

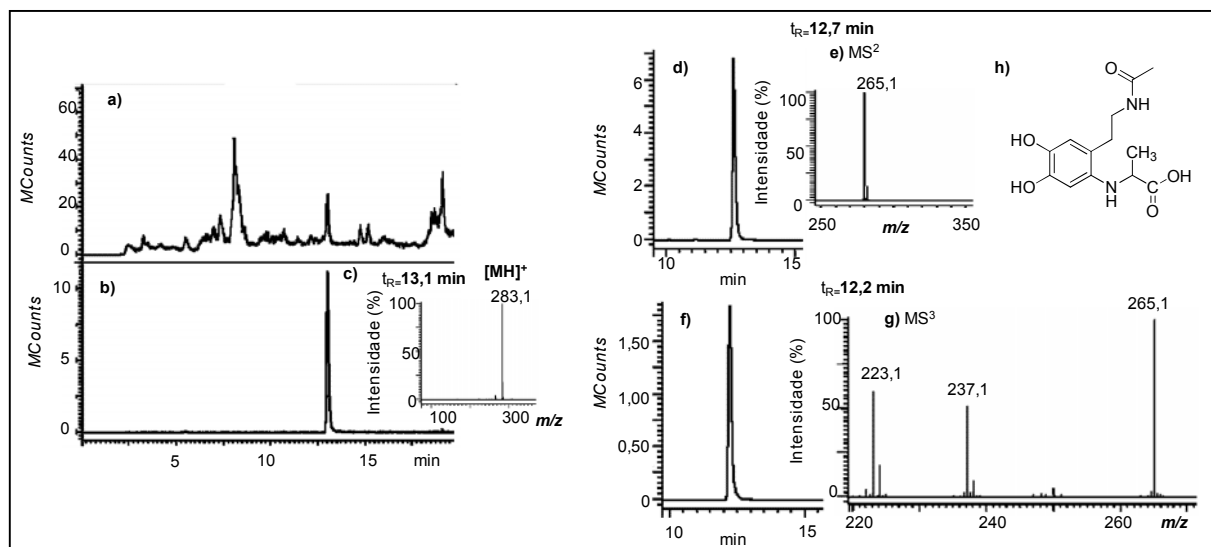
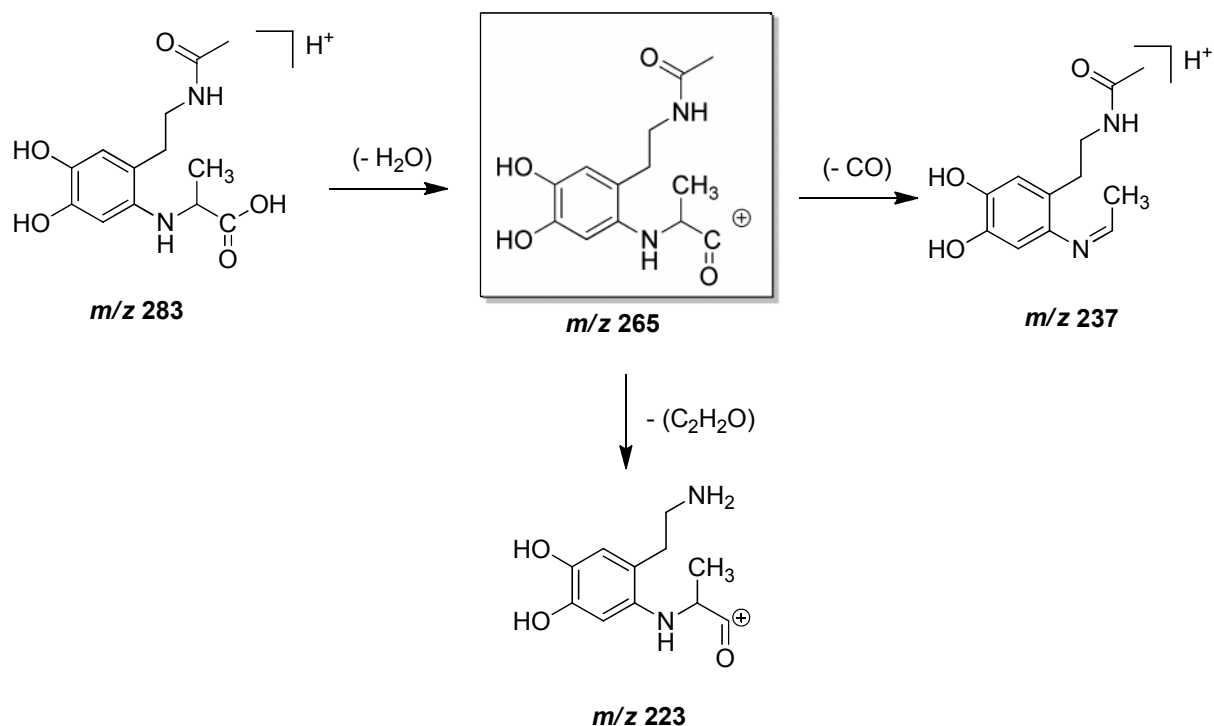


Figura II.48 – (a) LC-ESI-MS, cromatograma iónico total, da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:20 (HSA-A), obtido após hidrólise aos a.a. com pronase E e LAP. (b) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 283, possível aducto protonado da NADA com a Ala, e respectivo espectro de massa, (c). Espectros de LC-ESI-MS/MS obtidos para a fragmentação do ião a m/z 283. (d) Cromatograma iónico total, e respectivo espectro de massa, (e) MS^2 . (f) Cromatograma iónico total e (g) respectivo, MS^3 . (h) Estrutura proposta para o possível aducto da NADA com a Ala.

No espectro de LC-ESI-MS/MS do ião a m/z 283, obtivemos no cromatograma iónico total um único pico com t_R de 12,7 min e a m/z 265, que corresponde à perda de uma molécula de água, a partir do pico base (Figura II.48d e e). No entanto, este ião é insuficiente para a atribuição inequívoca do aducto, pelo que executámos a fragmentação do mesmo. Foram obtidos dois iões a m/z 237 e 223, com estruturas compatíveis, com a modificação da Ala pela espécie electrófila (Esquema II.16). Assim sendo, pela análise do MS^3 foi possível atribuir inequivocamente o aducto da NADA com a Ala. Uma vez que, na sequência peptídica da HSA o resíduo de Ala não é terminal, a sua modificação só pode ter ocorrido depois da reacção de modificação, muito provavelmente a remoção da NADA foi incompleta, e durante a hidrólise ocorreu a modificação com um resíduo de Ala, ou com um péptido com uma Ala terminal que foi posteriormente hidrolisado ao a.a..



Esquema II.16- Representação esquemática da fragmentação do aducto da NADA com o Ala, com $[MH]^+$ a m/z 283.

Foram ainda fragmentados outros potenciais aductos, como o ião a m/z de 349, possivelmente o aducto protonado da NADA com a His, no entanto, o resultado das fragmentações foi inconclusivo, impossibilitando a atribuição do ião.

Com o objectivo de obter uma digestão mais eficiente, uma vez mais realizou-se o procedimento de descrito por Waidyanatha *et al.*,⁷⁷ (cf. secção III.17.2.2, pág. 192), e obteve-se o respectivo espectro de LC-ESI-MS (Figura II.49). No cromatograma iónico total obtido após a hidrólise, foi detectado o pico a m/z 340, compatível com a modificação da NADA por um resíduo de Lys ou Gln, e o pico a m/z 283, a t_R de 13,3 min, compatível com o aducto protonado da NADA com a Ala. Este possível aducto, foi também identificado no cromatograma iónico total acima apresentado, obtido através das condições gerais de hidrólise aos a.a. (Figura II.48). Ambos os iões foram sujeitos a fragmentação.

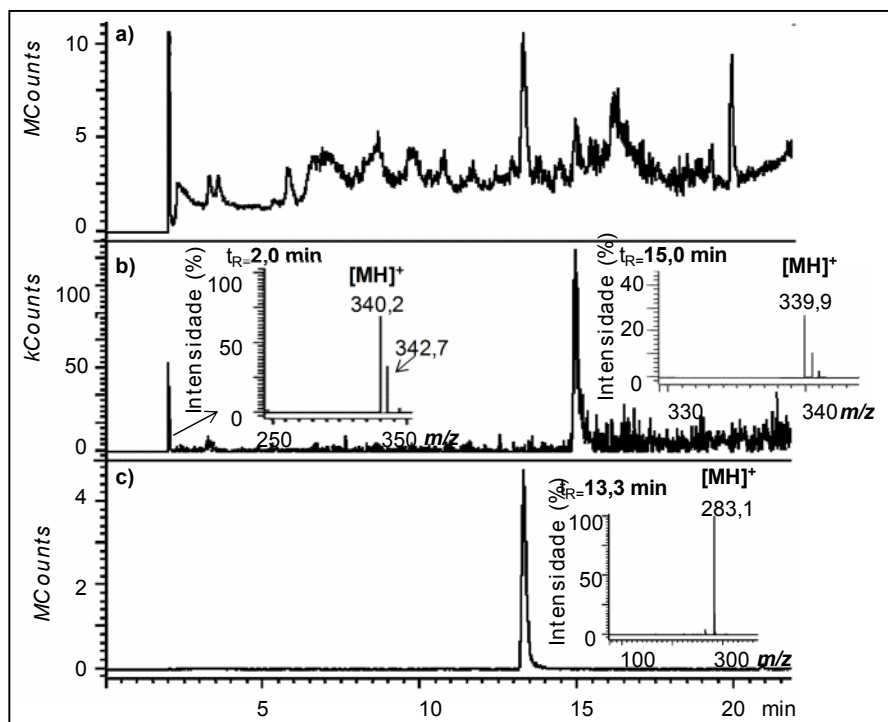


Figura II.49 - (a) Cromatograma iónico total (LC-ESI-MS), da incubação da HSA com NADA numa proporção de 1:20 (HSA-A), obtido após hidrólise segundo Waidyanatha *et al.*⁷⁷ (b) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 340, e respectivos espectros de massa. (c) LC-ESI-MS, cromatograma iónico extraído para o ião a m/z 283 e respectivo MS.

A fragmentação do possível aducto protonado da NADA com a Ala, (m/z 283), foi semelhante à observada na Figura II.48. Assim sendo, no MS² obteve-se um único pico a m/z 265, e no MS³ os fragmentos a m/z 237 e 223. Cujas estruturas propostas estão apresentadas no Esquema II.16. Podemos concluir que, uma vez mais estamos perante o aducto da NADA com a Ala.

Foi executado o espectro de MS² do ião a m/z 340, possível aducto da NADA com a Lys ou Gln (Figura II.50), onde podemos observar dois iões a m/z 196 e 147, que podem corresponder à molécula de NADA protonada e de Lys ou Gln protonada, respectivamente. Atendendo à nucleófilicidade do resíduo de Lys comparativamente ao de Gln, acreditamos que muito provavelmente foi o resíduo de Lys que sofreu modificação.

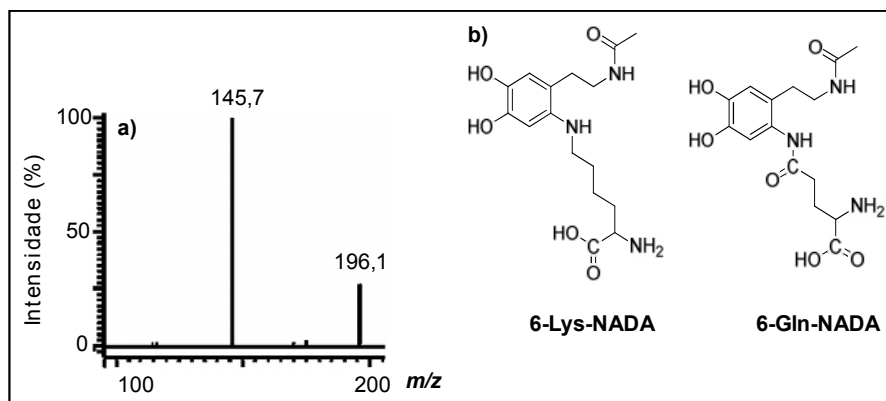
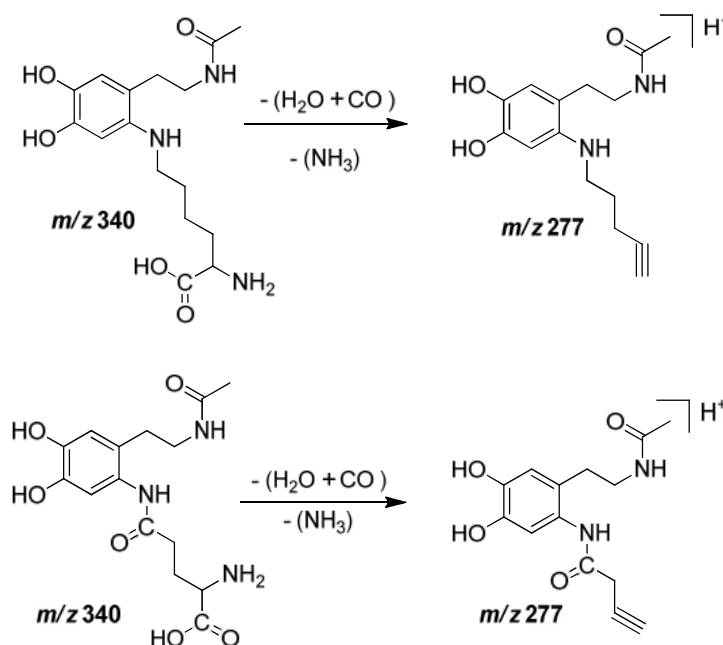


Figura II.50 - (a) Espectro de MS^2 do ião a m/z 339,9.

(b) Estruturas propostas para o possível aducto.

Realizou-se numa proporção de 1:20 (NADA/proteína), a modificação da Hb, (ensaio Hb-A), seguida das duas condições de hidrólise aos a.a, e foram obtidos os respectivos espectros de LC-ESI-MS. Na análise de massa intacta verificou-se um grau de modificação entre 2 a 3 resíduos na cadeia β da Hb.

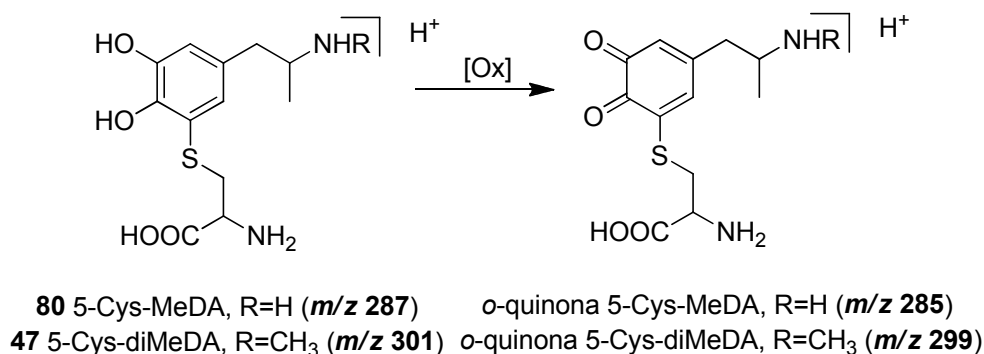
Nos espectros de LC-ESI-MS obtidos, foi identificado um possível aducto, da NADA com a Lys ou a Gln a m/z 340. Devido à intensidade do ião no MS adquirido após procedimento de digestão de Waidyanatha *et al.*,⁷⁷ este foi sujeito a fragmentação. No MS^2 identificou-se o ião a m/z 277, cuja estrutura proposta encontra-se representada no Esquema II.17. E uma vez mais, devido à nucleofilicidade do resíduo de Lys face ao de Gln, acreditamos que o aducto será no resíduo de Lys.



Esquema II.17 - Estrutura proposta para o possível aducto da NADA com a Lys ou a Gln, a m/z 340, e correspondente fragmento.

II.7.6.3 Hidrólise da HSA modificada com MeDA e diMeDA

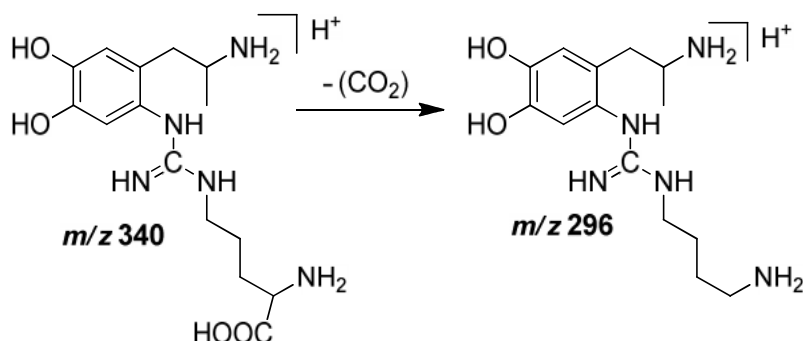
Para identificação dos aductos de a.a. dos metabolitos do *Ecstasy*, MeDA e diMeDA, foi utilizada uma metodologia idêntica à realizada para os aductos da NADA. Deste modo, foram utilizados como padrões os compostos previamente sintetizados no nosso laboratório, 5-Cys-MeDA (**80**) e 5-Cys-diMeDA (**47**) e obtidos os respectivos espectros de LC-ESI-MS. No cromatograma iônico total do aducto 5-Cys-MeDA (**80**), foi possível observar a molécula protonada a m/z 287 e t_R de 3,4 min, e a correspondente quinona protonada a m/z 285 e t_R de 3,8 min (Esquema II.18). Relativamente ao cromatograma total iônico do aducto 5-Cys-diMeDA (**47**), foi identificado o ião a m/z 301 e t_R de 3,5 min, que corresponde à molécula protonada; e o ião a m/z 299 e t_R de 4,0 e 4,4 min que pertence à respectiva quinona protonada (Esquema II.18).



Esquema II.18 - Representação dos aductos protonados dos compostos 5-Cys-MeDA (**80**) e 5-Cys-diMeDA (**47**) e respectivas quinonas.

A hidrólise aos a.a. segundo Waidyanatha *et al.*,⁷⁷ foi realizada após a modificação da HSA com os metabolitos do *Ecstasy* MeDA (**38**) e diMeDA (**37**), numa razão CA/HSA de 1:20, sendo as CA oxidadas com *mushroom tyrosinase*. Na análise de massa intacta de ambas as modificações, obteve-se uma média de dois resíduos de a.a modificados por molécula de proteína, (cf. secção II.7.4.1, pág. 91).

Na análise dos espectros de LC-ESI-MS foi identificado o possível aducto da MeDA (**38**) com a Arg, a m/z de 340, compatível com a molécula protonada, e t_R de 3,3 min. Realizou-se a fragmentação do ião (MS²), tendo-se obtido um ião a m/z 296, e t_R de 3,3 min, que pode corresponder à perda de CO₂ (Esquema II.19). Deste modo, pensamos que estamos perante o aducto da MeDA com a Arg.



Esquema II.19 - Representação da estrutura proposta para o aducto da MeDA com a Arg, e respectiva fragmentação.

Relativamente à modificação do metabolito diMeDA foi atribuído com intensidade significativa o presumível aducto protonado com o Trp, a m/z 384 e t_R de 2,1 min, que foi sujeito a fragmentação, dando origem ao ião a m/z 239 e t_R de 1,9 min. No entanto, o ião obtido não evidência uma fragmentação consistente com o aducto protonado, não permitindo a atribuição inequívoca do aducto com o Trp.

II.7.6.4 Hidrólise dos péptidos modificados com as CA

De modo a testar a eficiência das digestões aos a.a. realizadas nas proteínas modificadas, foi executado o procedimento de hidrólise segundo Antunes *et al.*,⁷² no péptido LQQCPF e nos aductos peptídicos 5-LQQCPF-NADA (**95**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**) e 5-LQQCPF-diMeDA (**99**) (Figura II.51), e obtidos os respectivos espectros de LC-ESI-MS (Figura II.52).

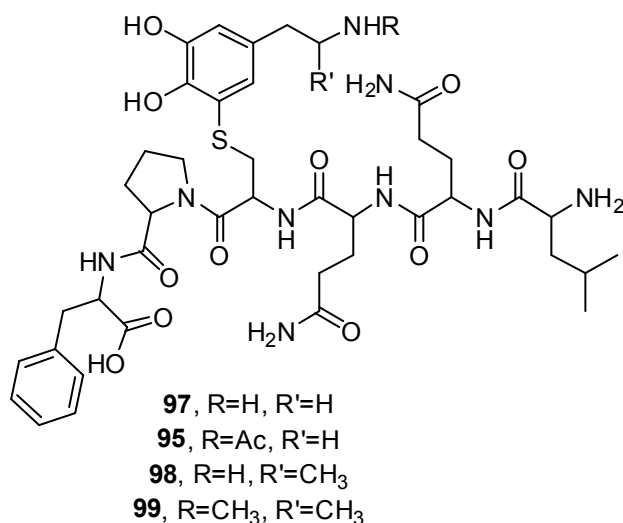


Figura II.51 - Representação dos aductos pépticos, 5-LQQCPF-NADA (**95**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**) e 5-LQQCPF-diMeDA (**99**).

A escolha destes compostos, com uma sequência peptídica conhecida, deve-se com a possibilidade de identificar os iões nos espectros de LC-ESI-MS, mesmo que a digestão não fosse completa. Além disso, estes aductos estão caracterizados por RMN, ESI e MALDI-

TOF-MS, no caso do composto 5-LQQCPF-NADA, (cf. secção II.7.3.2, pág. 81), tendo-se verificado que a modificação ocorreu no resíduo de Cys.

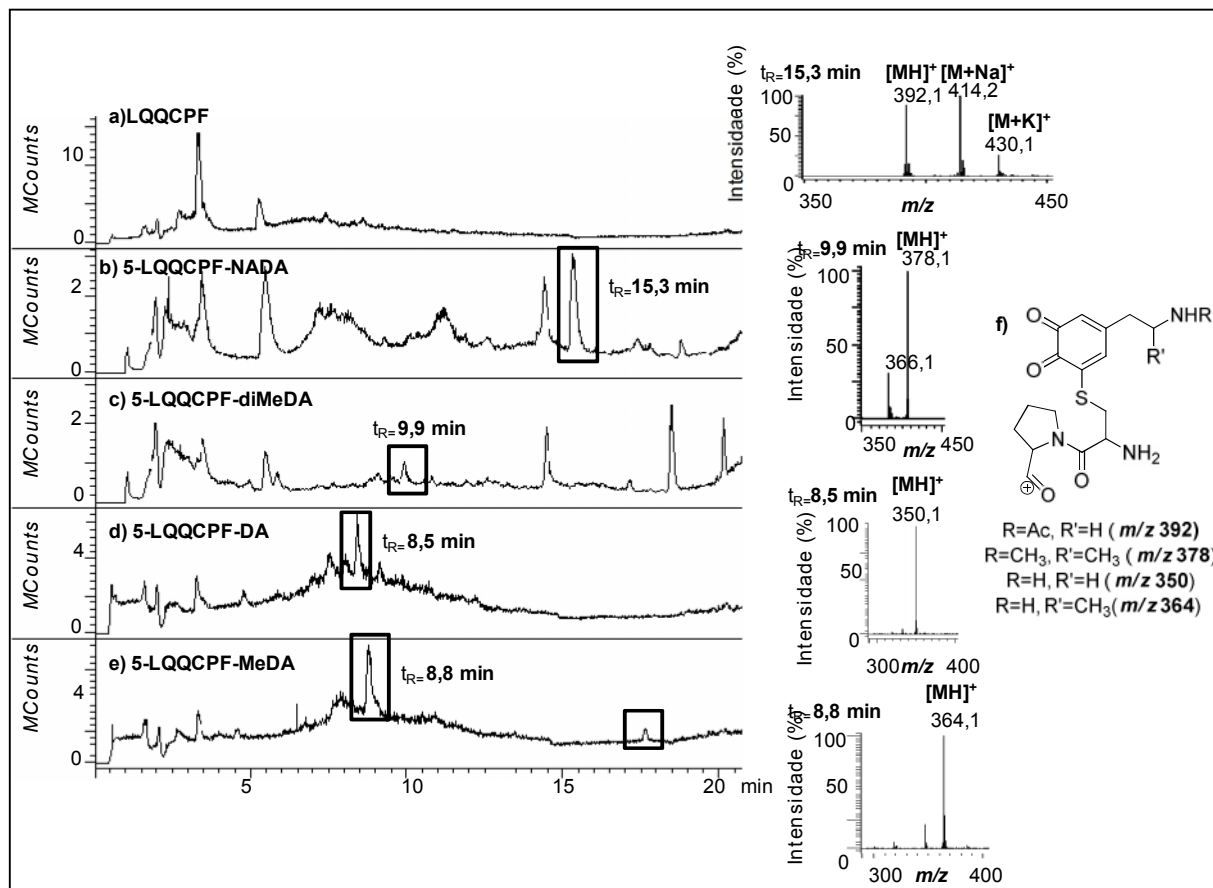


Figura II.52 - Espectros de LC-ESI-MS; cromatogramas iônicos totais, do péptido LQQCPF (a), e dos aductos 5-LQQCPF-NADA (**95**) (b), 5-LQQCPF-diMeDA (**99**) (c), 5-LQQCPF-DA (**97**) (d) e 5-LQQCPF-MeDA (**98**) (e). f) Estruturas propostas para os fragmentos peptídicos identificados.

Como controle realizou-se a hidrólise do péptido não modificado aos a.a., e obteve-se o respectivo cromatograma iônico total (Figura II.52a), os picos presentes foram excluídos da análise para identificação do aducto ou dos fragmentos peptídicos. Foi ainda identificado o pico a m/z 166, correspondente ao íon y_1 , este pico surge em todos os cromatogramas da Figura II.52, a $t_R=5,5$ min (Figura II.52a,b e c) e 4,6 min (Figura II.52d,e).

As hidrólises aos a.a., revelaram-se pouco eficazes, uma vez que não foram identificados, como o esperado no caso de uma digestão completa, os aductos da Cys na posição 5 das CA. No entanto, foram identificados os íões a m/z 392, 378, 364 e 350, correspondentes aos aductos oxidados da NADA, diMeDA, MeDA e DA, com os resíduos de cisteína e prolina (Figura II.52f).

Verificou-se deste modo, a dificuldade que as enzimas têm em hidrolisar os a.a. ligados ou muito próximos ao anel aromático, muito provavelmente porque o anel aromático dificulta a aproximação das enzimas, impedido o corte destes resíduos. Talvez o problema no caso da digestão das proteínas modificadas tenha sido o mesmo.

II.7.6.5 Aductos identificados após hidrólise aos a.a. e análise por LC-ESI-MS/MS

A hidrólise enzimática das proteínas modificadas aos a.a. com pronase E e LAP, para identificação dos resíduos modificados revelou-se um desafio, uma vez que as análises de LC-ESI-MS/MS revelavam hidrólises pouco eficientes, e comprometeram a identificação dos aductos modificados nas proteínas. Contudo, foram identificados alguns picos com razão m/z compatível com a modificação da CA, cujos iões apresentaram fragmentação compatível com possíveis aductos, e estão apresentados na Tabela II.46.

Tabela II.46 - Resultados das análises de LC-ESI-MS/MS realizadas para as reacções de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb por CA. As quinonas foram geradas com *mushroom tyrosinase* (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO_4 (Ensaio: “Proteína-B”).

Proteína	CA	Razão CA:proteína (oxidante)	Resíduos modificados
HSA	NADA	1:2 (A)	-(¹)
	NADA	1:2 (B)	-(¹)
	NADA	1:20 (A)	Lys e Ala*
	NADA	1:20 (B)	-(¹)
	MeDA	1:20 (A)	Arg
	diMeDA	1:20 (A)	-(¹)
Hb	NADA	1:2 (A)	Asp
	NADA	1:2 (B)	Asp
	NADA	1:4 (A)	-(¹)
	NADA	1:10 (A)	-(¹)
	NADA	1:20 (A)	Lys
	NADA	1:20 (B)	-(¹)
hhMb	NADA	1:2 (A)	Asp e Ala*
	NADA	1:2 (B)	Asp

-(¹) Não foi identificado nenhum resíduo modificado.

* Resíduo não modificado na proteína intacta.

II.7.6.6 Em Resumo:

- Para identificação dos aductos de a.a. foram utilizados como padrões nas análises por LC-ESI-MS, os compostos 5-Cys-NADA, 5-Cys-MeDA, 5-Cys-diMeDA e 6-His-NADA. Estes compostos juntamente com a NADA, foram sujeitos a fragmentação tendo-se identificado os iões fragmento.
- Verificámos que, nos padrões 5-Cys-NADA e 6-His-NADA e nos aductos identificados, o resíduo de a.a. juntamente com o grupo acetilo da NADA são os locais mais susceptíveis de sofrer fragmentação.
- Efectuaram-se duas condições de hidrólise enzimática, segundo Antunes *et al.*,⁷² e segundo Waidyanatha *et al.*.⁷⁷
- Nas reacções de modificação da Hb e da hhMb com NADA, numa razão NADA/proteína 1:2, foram identificados após fragmentação os aductos da NADA com o Asp a m/z de 327.
- Nas reacções de modificação da HSA com NADA, numa razão NADA/proteína 1:20, foi identificado o aducto da NADA com a Lys a m/z de 340, e o aducto da NADA com a Ala, a m/z de 283, sendo que este resíduo não pode ter sido modificado na proteína intacta.
- Para testar a eficiência das condições gerais de hidrólise aos a.a.,⁷² realizou-se a digestão do péptido LQQCPF nos aductos da NADA, da DA, da MeDA e da diMeDA, e verificou-se que a digestão não foi completa, uma vez que as enzimas apresentaram dificuldade em hidrolisar a.a. ligados ou muito próximos ao anel aromático. Este facto poderá explicar as dificuldades de identificação inequívoca de um número significativo de aminoácidos modificados nas proteínas testadas.

II.7.6.7 Comparação dos resultados da aproximação realizada para identificação dos resíduos modificados nas proteínas HSA, Hb, hhMb por CA

Para identificação dos resíduos modificados nas proteínas HSA, Hb e hhMb com CA, foram realizadas duas metodologias que envolveram as técnicas de MS, MALDI-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS. Os espectros de MALDI-TOF-MS permitiram a estimativa do número de resíduos modificados numa proteína, por subtração das massas da proteína modificada e nativa. Além disso, após hidrólise com a tripsina, foram identificados os péptidos que sofreram modificação por espécies electrófilas. Por MALDI-TOF-TOF-MS realizou-se a fragmentação dos possíveis aductos peptídicos, possibilitando especificar a localização exacta do resíduo modificado na sequência do péptido. Por LC-ESI-MS/MS, foram analisados os aductos de a.a., libertados após hidrólise enzimática com pronase E e LAP.

O resumo dos resultados das análises realizadas por MALDI-TOF-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS para as reacções de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb por CA, está apresentado na Tabela II.47.

As análises de massa intacta permitiram determinar o número de resíduos de a.a. modificados pelas espécies electrófilas, e demonstraram que as proteínas em estudo reagem covalentemente com as CA. Porém, verificou-se uma discrepância entre o número de resíduo modificados e a quantidade de péptidos e/ou a.a. identificados como aductos. Muito provavelmente porque as hidrólises foram pouco eficientes; ou porque a intensidade dos picos dos possíveis aductos identificados não foi suficiente para uma fragmentação conducente à sua identificação inequívoca. No entanto, tanto a aproximação que envolve o MALDI-TOF-MS como a que envolve o LC-ESI-MS/MS, permitiram a identificação de aductos.

Tabela II.47 - Resumo dos resultados das análises de MALDI-TOF-MS e LC-ESI-MS/MS realizadas para as reacções de modificação das proteínas HSA, Hb e hhMb por CA. As quinonas foram geradas com *mushroom tyrosinase* (Ensaio: “Proteína-A”) ou com NaIO₄ (Ensaio: “Proteína-B”).

Razão CA/proteína (oxidante)	Taxa de modificação MALDI-TOF-MS	Sequências e resíduos modificados MALDI-TOF-TOF-MS	Resíduos modificados LC-ESI-MS/MS
NADA/HSA1:2-A	32	-(¹)	-(¹)
NADA/HSA 1:2-B	54	LK CASLQK (198-205) Gln204	-(¹)
NADA/HSA 1:4-A	21	-(²)	-(²)
NADA/HSA 1:10-A	9	-(²)	-(²)
NADA/HSA 1:20-A	6	CCAAAD PHECYAK (314-372) His321 AFKAWAVARLSQR (210-222) Val216	Lys e Ala*
NADA/HSA 1:20-B	11	CCAAAD PHECYAK (314-372)	-(¹)
MeDA/HSA 1:20-A	2	HPD YSV VLLLRLAK (338-351) - Aps340 e/ou Tyr341 e/ou Ser342 e/ou Val343	Arg
diMeDA/HSA1:20-A	2	ADDKET CFAEEGKK (561- 574) - Cys567 e Phe568 CCKADD KETCFAEEGK (588- 573) - Lys594	-(¹)
DA/HSA1:20-A	0	-(²)	-(²)
NADA/Hb1:2-A	1-3 (Hb-α) 2-3 (Hb-β)	LHVD PENFR (96-104; Hb-β) His97	Asp
NADA/Hb 1:2-B	7	GHG KK (57-61; Hb-α) His58	Asp
NADA/Hb 1:4-A	3-6 (Hb-β)	-(¹)	-(¹)
NADA/Hb 1:10-A	1-3 (Hb-α) 1-5 (Hb-β)	-(¹)	-(¹)
NADA/Hb 1:20-A	2-3 (Hb-β)	SAVTAL WGK (9-17)	Lys
NADA/Hb 1:20-B	4 (Hb-α) 1-19 (Hb-β)	-(²)	-(¹)
NADA/hhMb1:2-A	1-6	FDKFK (43-47) Phe43 ou Asp44 e Lys45	Asp e Ala*
NADA/hhMb 1:2-B	1-5	-(²)	Asp

-(¹) Não foi identificado nenhum resíduo modificado. -(²) Análise não efectuada. * Resíduo não modificado na proteína intacta.

Pela análise da Tabela II.47 verificou-se que os resíduos modificados e caracterizados pela aproximação que envolve o MALDI-TOF-MS ou o LC-ESI-MS/MS, não são idênticos. Assim sendo, na maioria dos casos, a informação retirada das duas aproximações foi complementar. No entanto, verificou-se uma exceção no caso da reacção de modificação da NADA/hhMb1:2-A, onde foi identificado a Asp como local de modificação em ambas as técnicas.

II.8 Conclusões

Com este trabalho pretendeu-se estudar as potenciais vias de toxicidade de CA. Para tal, utilizou-se como compostos modelo da DA, a NADA e a DA-Cbz, e os metabolitos do *Ecstasy*, MeDA e a diMeDA. Nesse sentido, realizou-se a oxidação *in vitro* das CA às respectivas o-quinonas, enzimaticamente (*mushroom tyrosinase*) ou quimicamente (NaIO_4 , Sal de Frémy e Ag_2O), e estudou-se a reactividade destas espécies na presença de bionucleófilos (aminoácidos, nucleósidos, DNA, péptidos e proteínas representativas).

As reacções apresentam-se como regioselectivas, sendo a posição de modificação do anel da CA dependente do nucleófilo. Assim, nas reacções com nucleófilos de enxofre (NAcCys, Cys, GSH) a modificação ocorreu maioritariamente na posição 5 do anel da CA, enquanto nas reacções com nucleófilos de azoto (NAcHis e lmid) a modificação ocorreu na posição 6. Relativamente ao rendimento das reacções verificou-se que, na preparação de conjugados de enxofre as reacções de oxidação enzimática demonstraram uma maior eficiência, face às reacções de oxidação química; foi proposto uma interpretação mecanística para estas diferenças. Na preparação de derivados de azoto de CA, verificou-se que independentemente do oxidante utilizado, os rendimentos das reacções foram baixos. Já no caso das reacções da DA e da NADA com a dG e o DNA, nenhum aducto foi isolado em quantidade suficiente para a realização da sua caracterização estrutural total. Estas observações demonstram a pouca eficiência das o-quinonas em reagir com este tipo de nucleófilos.

Investigou-se ainda a modificação das proteínas representativas, HSA, Hb e hhMb, e do péptido modelo da HSA, LQQCPF, por reacções *in vitro* com as quinonas derivadas da DA, NADA, MeDA e diMeDA. Com a modificação do péptido LQQCPF foram obtidos e caracterizados os aductos 2-LQQCPF-DA (**96**), 5-LQQCPF-DA (**97**), 5-LQQCPF-MeDA (**98**) e 5-LQQCPF-diMeDA (**99**), modificados no resíduo de Cys. Estes aductos constituíram padrões para a monitorização das reacções *in vitro* da HSA com as CA, para a caracterização dos resíduos modificados por técnicas de espectrometria de massa e para testar a eficiência das digestões aos aminoácidos realizadas nas proteínas modificadas. Relativamente à modificação das proteínas observou-se uma relação entre a concentração da o-quinona (espécie potencialmente tóxica) e a extensão de modificação nas proteínas HSA e a Hb, tendo-se estabelecido uma relação de dose-efeito entre a quantidade de NADA-quinona usada por mg de proteína e a extensão de modificação na HSA e na Hb. Nas reacções de modificações de proteínas verificou-se que a hidrólise aos a.a. não foi completa, tendo-se concluído que as enzimas apresentaram dificuldade em hidrolisar a.a. ligados ou muito próximos ao anel aromático.

As proteínas modificadas com CA foram sujeitas a hidrólise enzimática a péptidos e a a.a, e os resíduos modificados foram caracterizados por MALDI-TOF-MS e por LC-ESI-MS/MS, respectivamente. Por MALDI-TOF-MS foram identificados três aductos de NADA com a HSA (Gln204, H321, e V216), dois aductos com a Hb (His97 na Hb- β , e His58 na Hb- α), e dois aductos com a hhMb (Phe43 ou Asp44, e Lys45), e ainda dois aductos da diMeDA com a HSA (Cys567 e Phe568). Por LC-ESI-MS/MS foram identificados os resíduos modificados com NADA na HSA, (Lys e Ala), na Hb (Lys e Asp), e na hhMb (Asp e Ala). À excepção da reacção de modificação da NADA/hhMb1:2-A, onde foi identificado a Asp como local de modificação em ambas as técnicas, verificou-se que a informação retirada destas aproximações foi complementar. Apesar das dificuldades encontradas na digestão das proteínas modificadas, este procedimento permitiu identificar os pontos de susceptibilidade reactiva nas proteínas modificadas, que podem eventualmente determinar as características toxicológicas das diferentes quinonas, levar a mecanismos de toxicidade e induzir efeitos adversos. Este conhecimento poderá vir a ser aplicado em estudos de biotransformações das CA-quinonas, *in vivo*, de modo a prever os possíveis resíduos indutores de toxicidade.

Capítulo III – Parte Experimental

III.1 Preâmbulo

III.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes adquiridos comercialmente não foram purificados salvo indicação em contrário. Nos ensaios foram sempre utilizados (L)- α -aminoácidos.

O tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) foi preparado dissolvendo 1,8 g de Na_2HPO_4 e 1,7 g de KH_2PO_4 em 250 mL de água destilada, utilizou-se ainda uma solução de NaOH 10% para acertar o pH. Para o tampão Tris [tris(hidroximetil)aminometano] (pH 7,4, 50 mM) dissolveu-se 605 mg de Tris em 100 mL de água destilada e acertou-se o pH utilizando uma solução de HCl 1M. O tampão *Phosphate Buffer Saline* (PBS), foi preparado por diluição de 1:10 de uma solução de PBS contendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 2,7 g de KH_2PO_4 para 100 mL de água destilada. Para o tampão Ambic (pH ~8, 12,5 mM) dissolveu-se 24,5 mg de bicarbonato de amônio (Ambic) em 25 mL de água MiliQ.

Para a digestão das proteínas aos a.a. foi utilizada uma solução enzimática de Pronase E (E.C.3.4.24.31) 0,53 mg/mL em PBS, preparada apenas quando necessário, a partir de uma solução *stock* de 10 mg/mL, preparada a partir do produto comercial da Fluka (5,05 U/mg em pó liofilizado. E uma solução de Leucina aminopeptidase M (LAP, E.C. 3.4.11.1) 0,13 mg/mL preparada a partir da solução comercial da Sigma 5,9 mg/mL (24 U/mg em suspensão em 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10 mM MgCl_2).

Para as digestões com tripsina, foram utilizadas diversas soluções. Para a solução de DL-ditiotreitol (DTT) 100 mM, dissolveu-se 3,4 mg de $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$ em 200 μL de Ambic (12,5 mM); para a solução de iodoacetamida (IAA) 600 mM dissolveu-se 3,7 mg de $\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$ em 33 μL de Ambic 12,5 (mM), esta solução foi mantida ao abrigo da luz e preparada imediatamente antes de usar, e preparou-se uma solução de tripsina 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, dissolvendo 20 μg de tripsina em 400 μL de TFA 0,01%.

As cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram efectuadas em placas de sílica gel 60 F254 da Merck com 0,2 mm de espessura, em suporte de alumínio. As cromatografias em camada fina preparativa (c.c.f.p.) foram efectuadas em placas de sílica Merck Kieselgel 60 F 254 com espessura de 0,5 mm. As placas foram observadas por luz ultra-violeta (UV) a 254 nm ou recorrendo a pulverização com o revelador indicado a cada situação. As cromatografias em coluna (c.c.) “flash” de fase normal foram efectuadas com sílica Kieselgel 60 (Merck), com granulometria de 0,040-0,063 mm, utilizou-se ainda sílica modificada de fase

reversa RP-18 (Merck). Em todos os casos o eluente será referido, indicando a proporção volumétrica dos componentes utilizados.

As soluções utilizadas na revelação das c.c.f., a saber reagente de Dragendorff, solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 5%, DNP (2,4-dinitrofenil-hidrazina), e solução de cloreto de cobre (CuCl_2), foram preparadas de acordo com literatura.¹³²

III.1.2 Equipamento

A purificação por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) efectuada na FCT-UNL realizou-se num cromatógrafo Merck Hitachi (Tokyo, Japan) equipado com uma bomba L-7100, um injector Rheodyne, uma interface D-7000, e um detector de fotodíodos L7450A. O HPLC analítico foi realizado usando um fluxo de 1 mL/min numa coluna de fase reversa da LichroCART® 250-4, enquanto o HPLC semi-preparativo foi executado usando um fluxo de 6 mL/min numa coluna LichroCART® 250-10. Em todos os programas foi utilizado um sistema binário de solventes, solvente A e B. O solvente A foi preparado adicionando ácido trifluoracético (TFA) a água desionizada até pH 2,5 e o solvente B consiste numa mistura (1:1) de acetonitrilo (MeCN) e solvente A. O gradiente linear normalmente usado no HPLC semi-preparativo foi de 10 min, de 100-65% de solvente A; 2 min de 65-25% de solvente A, seguidos de 3 min de 25-100% de solvente A, o programa será referenciado ao longo da tese como HPLC-FCT-1. No IST utilizou-se um HPLC equipado com um sistema Ultimate 3000 da Dionex, uma bomba quaternária (LPG-3400A), um injector automático (Rheodyne Model 8125) e um detector de fotodíodos (DAD, Ultimate 3000). O HPLC analítico realizou-se numa coluna de fase reversa Luna C 18(2) (250 × 4,6 mm, 5 µm) da Phenomenex, com um fluxo de 1 mL/min, enquanto que o HPLC semi-preparativo realizou-se numa coluna Phenomenex, C 18(2) (250 × 10 mm, 5 µm) com um fluxo de 3 mL/min. Em todos os programas foi utilizado um sistema binário de solventes, onde o solvente A consistia numa solução de água em ácido fórmico 0,1% (v/v) e o solvente B MeCN. O gradiente linear normalmente utilizado para purificações no HPLC semi preparativo foi de 15 min a 95-62% de solvente A, 3 min de 62-0% de solvente A, 2 min com 0% de solvente A, 2 min, de 0-95% de solvente A e 3 min a 95% de solvente A, o programa será referenciado como HPLC-IST-1. No HPLC analítico foi utilizado o mesmo programa, mas com um fluxo de 1mL/min, o programa será mencionado ao longo da tese como HPLC-IST-2. Foi ainda utilizado outro programa no HPLC analítico com a referência HPLC-IST-3, para purificação dos compostos nas reacções com o DNA: 30 min a 95-30% de solvente A, 2 min de 30-0% de solvente A, 3 min com 0% de solvente A, 5 min, de 0-95% de solvente A e 5 min a 95% de solvente A.

Na FCT-UNL os espectros de RMN foram traçados num espectrómetro Bruker ARX 400 e num Bruker Avance III 400, semelhante ao espectrómetro utilizado no IST. Os desvios químicos δ são dados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento J dadas em Hertz (Hz). Na descrição dos espectros os dados são apresentados da seguinte forma: **Núcleo estudado (solvente):** desvio químico (δ , em ppm); [intensidade relativa do sinal (nH, nº de prótons); multiplicidade do sinal (s- singuleto; d- duplete; t- tripleto; dd- duplo duplete; sx- sexteto; m- multiplete...); constante de acoplamento (J , Hz) e atribuição na molécula]. Em moléculas com prótons proquirais, como é o caso de alguns prótons em grupos metileno, estes serão atribuídos como Ha e Hb, juntamente com a respectiva atribuição na molécula. Na atribuição dos prótons e carbonos de confórmoros, estes serão designados com e sem linha (') a seguir à atribuição da molécula, no entanto a sua atribuição será arbitrária, uma vez que a proporção dos isómeros conformacionais nos espectros é de 1:1.

Os espectros de infravermelho (IV) foram traçados na FCT-UNL num espectrómetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 1000 FT-IR. Na descrição dos espectros são indicadas apenas as frequências mais intensas ou características. Os dados são apresentados pela seguinte ordem: suporte de amostra utilizado: KBr (em pastilha de brometo de potássio para compostos sólidos), NaCl (em discos de cloreto de sódio para compostos dissolvidos, líquidos ou óleos); frequência do máximo de uma banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm^{-1}), tipo de banda: MF (muito forte), F (forte), FI (forte larga), m (média), ml (média larga), f (fraca); e atribuição a um grupo funcional na molécula.

As análises de LC-ESI-MS/MS foram realizadas no IST, num sistema 500-MS LC Ion Trap (Varian, Inc., Palo Alto, CA), composto por um amostrador automático ProStar 410, duas bombas cromatográficas 210-LC, um detector de fotodíodos ProStar 335 e um espectrómetro de massa com fonte de ionização por ESI. As amostras foram injectadas numa coluna Luna C18 (2) (150 mm \times 2 mm, 3 μm ; Phenomenex, Torrance, CA) através de um injector Rheodyne com um *loop* de 20 μL . Como gradiente linear utilizou-se o programa HPLC-IST-1, com um fluxo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. O espectrómetro de massa foi utilizado no modo positivo, estando os parâmetros de utilização optimizados, voltagem da agulha de *spray*, +4,8 kV; voltagem do capilar, 20 V; e RF *loading*, 90%. O azoto foi utilizado como gás nebulizador e de secagem a pressões de 50 e 30 psi, respectivamente e à temperatura de 350 °C no caso da secagem. Os espectros de MS/MS foram obtidos com uma janela de isolamento de 1,5 Da, valores de energia de 0,9 and 1,2 V e tempo de excitação de 10 ms. Os dados processados foram tratados no *software* Varian MS Control 6,9.

Para análises de MALDI-TOF-MS as amostras foram colocadas numa placa de MALDI dissolvidas numa matriz. Foi utilizado como matriz uma solução de ácido sinapínico (10 mg/mL) para proteínas e uma solução de ácido α -cyano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL) para péptidos. Após colocar a mistura amostra-matriz (1:1) na placa de MALDI, deixou-se secar ao ar até completa cristalização.

Alguns espectros de MALDI-TOF-MS foram realizados na Unidade de Espectrometria de Masas da Universidade de Santiago de Compostela, usando uma espectrómetro Ultraflex III TOF/TOF da Bruker, equipado com um laser tipo *smartbeam*, uma fonte de ionização *scoutMTPM*. O trajecto de voo foi realizado em modo linear de 182 cm e ionização positiva. Para a aquisição automática de dados utilizou-se o software AutoXecute e WARP-LC.

Para as análises de MALDI-TOF-MS realizadas na FCT-UNL utilizou-se o modelo da Voyager-DE™ PRO Biospectrometry Workstation da Applied Biosystems (Foster City, CA). É um espectrómetro de massa com analisador por tempo de voo e uma fonte de dessorção e ionização a laser assistida por matriz (MALDI), o aparelho vem equipado com um laser de Azoto (337 nm) e um analisador TOF que permite trabalhar no modo linear utilizado para determinação da massa intacta das proteínas e no modo reflector utilizado para análise dos péptidos.

Para a análise de massa intacta da proteína o espectrómetro foi calibrado usando *bovine serum albumin* (BSA) tendo-se obtido um pico a m/z de 67081,03 correspondente ao ião monopositivo. No caso das análises de massa dos péptidos foram efectuadas duas calibrações externas sucessivas com os picos monoisotópicos dos seguintes péptidos e respectiva fragmentação péptidica: Bradykinin (m/z : 757,3997), Angiotensin II (m/z : 1046,5423), P14R (m/z : 1533,8582) e ACTH (m/z : 2465,1989).

As medições foram realizadas em modo reflector positivo com os seguintes parâmetros: *accelerating voltage* de 20 kV, *voltage grid* 75,1 %, 0,0002% *guide wire* e *delay time* de 80 ns. O espectro obtido para cada amostra resulta da média de 500 disparos de laser. O *software* utilizado para tratamento dos espectro foi o Data Explorer serie 4.

Os péptidos de interesse (*i.e.*, aqueles que têm massa consistente com modificação com as CA) foram seleccionados para experiências de MS/MS. As análises de MALDI-TOF-TOF-MS, foram realizadas no modelo Applied biosystems 4700 Proteomics Analyser, da marca Applied biosystems/MDS SCIEX e utilizou-se o Software 4000 Series Explorer V3.0.

Os espectros de massa de alta resolução (HRMS-ESI) foram obtidos na Unidade de Espectrometria de Masas da Universidade de Santiago de Compostela (Micromass; modelo: AutoSpecQ). Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: **HRMS-ESI (+)**: razão massa/carga do ião molecular (m/z), fórmula molecular (massa exacta teórica do ião molecular correspondente) e massa exacta obtida experimentalmente.

Os espectros de UV/Vis foram traçados num espectrofotómetro modelo HELIOS UV *Visible spectrophotometers* da Thermo Corporation, e utilizou-se o *software* Vision Pro versão 2,02. Na descrição dos espectros os dados são apresentados pela seguinte ordem: **UV/vis, λ** : valor obtido em nm.

Os pontos de fusão, foram determinados num aparelho de placa aquecida Kofler, modelo *Reichert Thermoval* e não foram corrigidos.

III.1.3 Numeração de compostos

Segundo as regras da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) a numeração da DA seria 4-(2-aminoetil)benzeno-1,2-diol, no entanto, para simplificar a numeração a utilizar aquando a caracterização estrutural, aplicar-se-á como modelo a numeração usada para a DA em diversas publicações,^{20, 31} como apresentado na Figura III.1. Relativamente à numeração dos aductos com a.a. ou péptidos, será aplicada a numeração utilizada para os a.a. livres, onde o carbono ligado ao substituinte R é denominado carbono α . A numeração apresentada será estendida às diversas CA e respectivos aductos, apresentados neste trabalho.

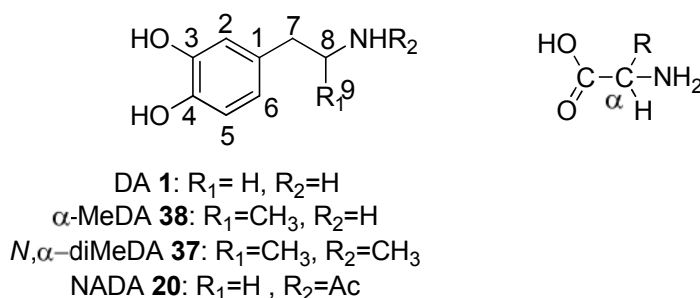


Figura III.1 - Representação de CA e um a.a. geral, com a numeração a utilizar ao longo da tese.

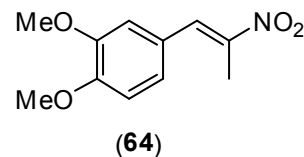
Em relação à nomenclatura de a.a. em péptidos, será apresentada só pela abreviatura (com uma letra) para facilitar a leitura, e nos restantes compostos, p.e. aductos ou resíduos modificados, pelo símbolo. Por exemplo, para a cisteína será C (abreviatura) ou Cys (símbolo).

III.2 Síntese do metabolito do *Ecstasy*, α -metildopamina (38)

III.2.1 Preparação do composto *trans*-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-nitropropeno (64)

Método geral - Num balão de fundo redondo colocou-se 3,4-dimetoxibenzaldeído (**61**) (10,0 g; 60 mmol), nitroetano (**63**) (99 mL, 1,38 mol) e acetato de amónia (4,6 g, 60 mol), e deixou-se a reacção sob refluxo. A mistura reaccional foi seguida por c.c.f. (CH_2Cl_2 , DNP, R_f : 0,49), até ao consumo total do material de partida (12 horas). Removeu-se o excesso de nitroetano (**63**) por evaporação a pressão reduzida. Dissolveu-se o óleo obtido em éter etílico (100 mL); extraiu-se com água (3 x 20 mL) e BRINE (3 x 20 mL). Secou-se a fase etérea com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à securo, e recristalizou-se o produto em etanol.

O composto *trans*-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-nitropropeno, (**64**) foi sintetizado de acordo com o método geral em III.2.1, sendo obtido sob a forma de cristais amarelos, (9,5 g, 71 %). **P.f.**: 69-73 °C



(Lit 71-72)¹³³. **IV (KBr)**, ν_{max} : 2931 (f, C-H), 1657 (m, C=C_{trans}),

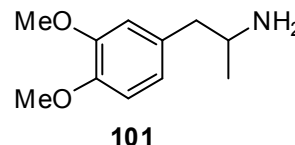
1596 (m, C=CAr), 1513 (F, NO₂), 1445 (m, C-H), 1314 (F, NO₂), 1257 (F, C-O) cm^{-1} . **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 2,49 (3H, s, H₉), 3,92 (3H, s, OCH₃), 3,94 (3H, s, OCH₃), 6,94 (1H, d, J = 8,2 Hz, H₅), 6,97 (2H, d, J = 2,8 Hz, H₂), 7,09 (1H, d, J = 8,2 Hz, H₆), 8,07 (1H, s, H₇) ppm. **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 14,2 (C₉), 56,0 (OCH₃), 111,2 (C₂), 113,1 (C₅), 124,0 (C₆), 125,0 (C₁), 133,8 (C₇), 145,9 (C₈), 149,1 (C₄), 150,8 (C₃) ppm. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.¹³³

III.2.2 Preparação do composto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-amino-propano (101)

Método geral - Num balão de três tubuladoras equipado com um condensador e uma ampola isobárica em atmosfera inerte, colocou-se LiAlH₄ (0,95 g, 25 mmol) e THF anidro (10 mL). Pela ampola de adição adicionou-se lentamente uma solução de *trans*-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-propeno (**64**) (2 g, 9 mmol) em THF anidro (15 mL). A mistura reaccional permaneceu sob refluxo durante 4 h, e foi sendo seguida por c.c.f. (CH_2Cl_2 / MeOH 95:5; Dragendorf). O excesso de LiAlH₄ foi destruído por adição lenta de água (2 mL) e de uma solução de NaOH 15 % (2 mL). A mistura resultante foi filtrada, sendo o resíduo lavado com

THF. A solução filtrada foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à securo, tendo-se obtido um óleo acastanhado, destilado num destilador de bolas sob pressão reduzida a temperaturas entre 175 °C – 200 °C.

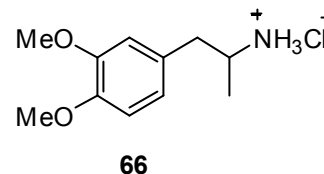
O composto **(R,S)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-aminopropano (101)**, foi obtido de acordo com o método geral III.2.2, sob a forma de um óleo amarelo, (1,2 g, 68 %). **IV (KBr)**, ν_{\max} : 3344 (f, N-H), 2958 (m, C-H), 1589 (m, C=CAr), 1516 (F, C=CAr), 1464 (m, CH₂), 1263 (F, C-N), 1237 (m, C-O) cm⁻¹. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 1,11 (3H, d, J = 6,2 Hz, H₉), 2,43 (1H, dd, J = 13,3 e J = 8,2 Hz, H_{7a}), 2,65 (1H, dd, J = 13,3 e J = 5,1 Hz, H_{7b}), 3,09-3,17 (1H, m, H₈), 3,84 (3H, s, OCH₃), 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,70-6,72 (3H, m, H_{2/6/5}) ppm. De acordo com a literatura.¹³⁴ **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 23,5 (C₉), 46,1 (C₇), 48,5 (C₈), 55,8 (OCH₃), 55,9 (OCH₃), 111,2 (C₂), 112,4 (C₅), 121,1 (C₆), 132,3 (C₁), 147,4 (C₄), 148,8 (C₃) ppm.



III.2.3 Preparação do hidrocloreto **(R,S)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-animopropano (66)**

Método geral – Dissolveu-se **(R,S)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-aminopropano (101)**, (1,2 g, 6,09 mmol) em éter etílico anidro, e adicionou-se Et₂O anidro saturado em HCl (g), fazendo-se precipitar o respectivo hidrocloreto.

O hidrocloreto **(R,S)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-animopropano, (66)** foi obtido segundo o método geral em III.2.3, e obtido sob a forma de um sólido branco (506,0 mg, 36 %). **IV (KBr)**, ν_{\max} : 3355 (f, N-H), 2935 (F, C-H), 1592 (m, N-H), 1519 (F, C=CAr), 1267 (F, C-N) cm⁻¹. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,22 (3H, d, J = 4,0 Hz, H₉), 2,75-2,82 (2H, m, H₇), 3,49-3,54 (1H, m, H₈), 3,76 (3H, s, OCH₃), 3,77 (3H, s, OCH₃), 6,80 (1H, d, J = 8,0 Hz, H₆), 6,86 (1H, s, H₂), 6,94 (1H, d, J = 8,0 Hz, H₅) ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ : 17,5 (C₉), 39,7 (C₇), 49,1 (C₈), 55,7 (OCH₃), 112,1 (C₂), 112,9 (C₅), 122,1 (C₆), 129,1 (C₁), 147,3 (C₄), 148,3 (C₃) ppm.

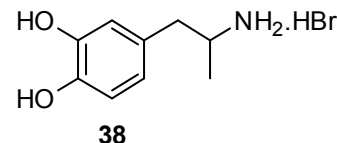


III.2.4 Preparação do composto α -metildopamina (38)

Método geral - Num balão com duas tubuladuras, equipado com condensador, colocou-se 14 mL de HBr 47%, e desarejou-se com Ar durante 1 h. Adicionou-se o hidrocloreto

(*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-animopropano (**66**), (100,0 mg, 0,43 mmol), e a mistura foi mantida sob agitação durante 3 h a 125 °C, e durante 1 h à t.a.. No final evaporou-se à securo no evaporador de pressão reduzida.

O composto **α -metildopamina (38)**, foi obtido de acordo com o método geral em III.2.4, sob a forma de um óleo castanho escuro (73,0 mg, 68 %). **UV/vis**, λ : 231 e 285 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,18 (3H, d, J = 6,4 Hz, H9), 2,64-2,76 (2H, m, H7), 3,45 (1H, sx, J = 6,8 Hz, H8), 6,62 (1H, d, J = 6,4 Hz, H6), 6,71 (1H, s, H2), 6,79 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5) ppm.

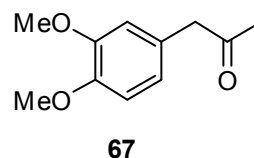


III.3 Síntese do metabolito do *Ecstasy*, *N*, α -dimetildopamina (37)

III.3.1 Preparação do composto 1-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-ona (67)

Método geral - Dissolveu-se *trans*-1-(3,4-dimetoxifenil)-2-nitropropeno (**64**) (2,0 g, 8,9 mmol) em etanol (20 mL). Adicionou-se água destilada quente (42 mL) e colocou-se a reação sob agitação constante e vigorosa, e juntou-se limalhas de ferro (4,3 g), cloreto de ferro hexahidratado (0,14 g) e ácido clorídrico concentrado (3,16 mL). A mistura reaccional permaneceu sob refluxo durante 10 h, sendo seguida por c.c.f. ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1), CuCl_2). Retirou-se o óxido de ferro por filtração por celite® e evaporou-se à securo. Dissolveu-se, em éter etílico e lavou-se a fase etérea com uma solução de ácido clorídrico a 10 %. Recolheu-se as fases orgânicas, e secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à securo. Obteve-se um óleo amarelo.

O produto **1-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-ona (67)**, obtido pelo método geral III.3.1, foi purificado por destilação a pressão reduzida a 190 °C e obtido sob a forma de um óleo amarelo (1,1 g, 65 %). **IV (KBr)**, ν_{max} : 3000, 2938 (m, C-H), 1710 (F, C=O), 1591 (m, C=CAr), 1516 (F, C=CAr), 1465 (m, CH_2), 1262 (F, C-O), 1238 (m, C-O) cm^{-1} . **$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 2,13 (3H, s, COCH_3), 3,61 (2H, s, H7), 3,85 (6H, s, OCH_3), 6,68 (1H, d, J = 1,8 Hz, H2), 6,73 (1H, dd, J = 8,1 e 1,8 Hz, H6), 6,82 (1H, d, J = 8,1 Hz, H5), **$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3)** δ : 29,0 (COCH_3), 50,5 (C7), 55,8 (OCH_3), 111,4 (C2), 112,3 (C5), 121,5 (C6), 126,8 (C1), 148,1 (C4), 149,0 (C3), 206,7 (CO) ppm.

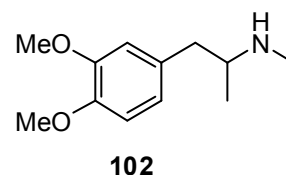


III.3.2 Preparação do composto 1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (102)

Método geral – Dissolveu-se 1-(3,4-dimetoxifenil)propan-2-ona (**67**), (1,1 g, 6,0 mmol), em etanol (20 mL), e adicionou-se metilamina (4,8 mL) e Pd/C (0,38 g). Colocou-se a mistura reaccional sob atmosfera de hidrogénio. A reacção permaneceu sob agitação durante 20 h, à t.a., sendo controlada por c.c.f. (CH₂Cl₂/MeOH (9:1), Dragendorf). O catalisador foi removido por filtração sob celite® e evaporou-se o solvente. Dissolveu-se em diclorometano e extraiu-se com uma solução de ácido clorídrico a 10%, juntou-se as fases aquosas, neutralizou-se com carbonato de potássio e extraiu-se com diclorometano. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura. O produto foi purificado por destilação a pressão reduzida a 220 °C.

O composto **1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina** (**102**), foi preparado segundo o método geral em III.3.2., e obtido sob a forma de um óleo amarelo (820 mg, 65 %).

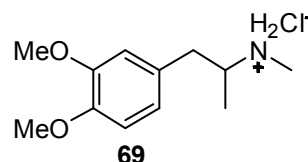
¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,03 (3H, d, *J*= 8,0 Hz, H9), 2,35 (3H, s, NH-CH₃), 2,56-2,58 (2H, m, H7), 2,69-2,74 (1H, m, H8), 3,82 (3H, s, OCH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 6,68-6,79 (3H, m, H2/5/6). ¹³C-RMN (CDCl₃) δ: 19,6 (C9), 33,9 (NH-CH₃), 43,1 (C7), 55,7 (OCH₃), 55,8 (OCH₃), 56,3 (C8), 111,2 (C2), 112,4 (C5), 120,1 (C6), 131,9 (C1), 147,4 (C4), 148,7 (C3) ppm.



III.3.3 Preparação do composto hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (69)

O hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (**69**), foi preparado de acordo com o método geral em III.2.3, partindo de 1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (820 mg, 3,92 mmol). O produto apresenta-se sob a forma de cristais

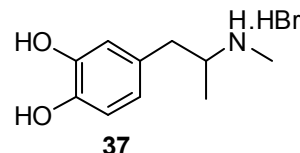
brancos (589 mg, 61 %). **IV (KBr)**, ν_{max} : 2962 (f, C-H), 1591 (m, N-H), 1519 (F, C=CAr), 1459 (m, CH₂), 1273 (F, C-O), 1238 (m, C-O) cm⁻¹. ¹H-RMN (D₂O) δ: 1,16 (3H, d, *J*= 6,5 Hz, H9), 2,58 (3H, s, NH-CH₃), 2,72 (1H, dd, *J*= 13,9 e *J*= 8,0 Hz, H7a), 2,89 (1H, dd, *J*= 13,9 e *J*= 6,2 Hz, H7b), 3,37-3,42 (1H, m, H8), 3,73 (3H, s, OCH₃), 3,74 (3H, s, OCH₃), 6,77 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H5/6), 6,82 (1H, s, H2), 6,89 (1H, d, *J*= 8,1 Hz, H5/6) ppm. ¹³C-RMN (D₂O) δ: 15,2



(C9), 30,3 (NH-CH₃), 38,7 (C7), 56,1 (OCH₃), 56,8 (C8), 112,5 (C2), 113,2 (C5), 122,5 (C6), 129,2 (C1), 147,7 (C4), 148,7 (C3) ppm.

III.3.4 Preparação do composto *N*, α -dimetildopamina (**37**)

O composto ***N*, α -dimetildopamina (**37**)**, foi obtido através do método geral em III.2.4, partindo do hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (**69**), (100 mg, 0,41 mmol).



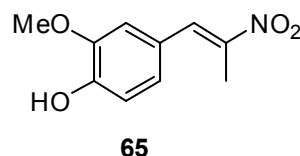
Obtiveram-se 85 mg do produto (**37**) sob a forma de um óleo casta-

nho escuro, (80 %). **UV/vis**, λ : 258 e 288 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,16 (3H, d, J = 6,8 Hz, H9), 2,58 (3H, s, N-CH₃), 2,68 (1H, dd, J = 13,6 e J = 8,0 Hz, H7a), 2,81 (1H, dd, J = 13,6 e J = 6,0 Hz, H7b), 3,36 (1H, sx, J = 6,8 Hz, H8), 6,62 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5/6), 6,71 (1H, s, H2), 6,79 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5/6) ppm.

III.4 Síntese do hidrocloreto de (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxifenol (**40**)

III.4.1 Preparação do composto 2-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)fenol (**65**)

O composto **2-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)fenol (**65**)**, foi preparado pelo método geral em III.2.1, tendo como material de partida o composto 3-metoxi-4-hidrobenzaldeído (**62**), (10 g, 66 mmol).

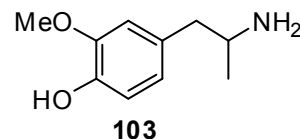


Para purificação, realizou-se uma c.c. “flash” (CH₂Cl₂), e o produto

foi obtido sob a forma de um sólido amarelo, (7,0 g, 51 %). **P.f.**: 77-82 °C (Lit 97-99)¹³³. **IV (KBr)**, ν_{max} : 3432 (F, O-H), 2931 (m, C-H), 1651 (m, C=C), 1613 e 1582 (m, C=CAr), 1503 (f, NO₂), 1462 (m, CH₃), 1393 (f, NO₂), 1264 (F, C-O-C), 1029 (f, C-OH) cm⁻¹. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 2,47 (3H, s, H9), 3,96 (3H, s, OCH₃), 5,69 (1H, s, OH), 6,91-7,07 (3H, m, H2/5/6), 8,02 (1H, s, H7) ppm. **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ : 14,1 (C9), 56,0 (OCH₃), 110,7 (C2), 115,7 (C5), 123,8 (C6), 125,6 (C1), 133,6 (C7), 145,8 (C8), 146,2 (C4), 148,1 (C3) ppm. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.¹³³

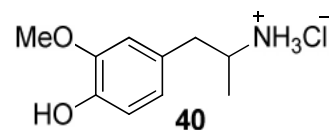
III.4.2 Preparação do composto (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (**103**)

O composto (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (**103**), foi sintetizado seguindo o método III.2.2, partindo de 2-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)fenol (**65**), (2,0 g, 9,6 mmol). Foi purificado por recristalização com metanol/éter etílico e obtido sob a forma de um óleo castanho (530 mg, 30 %). ¹H-RMN (CDCl₃) δ: 1,11 (3H, d, *J*=6,2 Hz, H9), 2,39 (1H, dd, *J*= 13,4 e *J*=4,4 Hz, H7a), 2,64 (1H, dd, *J*= 13,4 e *J*=5,1 Hz, H7b), 3,10-3,30 (1H, m, H8), 3,96 (3H, s, OCH₃), 5,69 (1H, s, OH), 6,67-6,83 (3H, m, H2/5/6) ppm.



III.4.3 Preparação do hidrocloreto de (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (**40**)

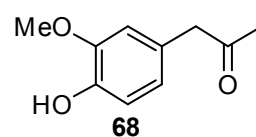
O hidrocloreto de (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (**40**), foi preparado segundo o método geral em III.2.3, partindo de (*R,S*)-4-(2-aminopropil)-2-metoxi-fenol (**103**) (530 mg, 2,9 mmol), e apresenta-se sob a forma de cristais bege (400 mg, 63 %). **IV** (KBr), ν_{\max} : 3392 (F, O-H), 2929 (m, C-H), 1591 (m, N-H), 1497 (F, C-H), 1255 (F, C-O), 1027 (f, C-O) cm⁻¹. ¹H-RMN (D₂O) δ: 1,18 (3H, d, *J*= 6,5 Hz, H9), 2,51 (1H, dd, *J*= 8,4 e *J*=1,6 Hz, H7a), 2,64 (1H, dd, *J*= 13,8 e *J*=6,2 Hz, H7b), 3,26-3,34 (1H, m, H8), 3,67 (3H, s, OCH₃), 6,41 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H6), 6,50 (1H, s, H2), 6,80 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H5) ppm. ¹³C-RMN (D₂O) δ: 19,1 (C9), 41,4 (C7), 49,2 (C8), 56,5 (OCH₃), 113,3 (C2), 117,1 (C5), 118,9 (C6), 131,3 (C1), 149,2 (C4), 153,2 (C3) ppm.



III.5 Síntese do hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (**39**)

III.5.1 Preparação do composto 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona (**68**)

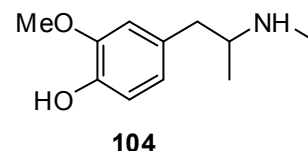
O composto 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona (**68**), foi sintetizado de acordo com o método geral em III.3.1, partindo de 2-metoxi-4-(2-nitroprop-1-enil)fenol (2,0 g, 9,6 mmol) (**65**). O produto (**68**) foi purificado por destilação a pressão reduzida a 220 °C, sendo obtido sob a forma de um óleo amarelo (1,10 g, 64 %). **IV** (KBr), ν_{\max} : 3419 (ml, OH), 2935 (m, C-H), 1706 (F,



C=O), 1592 (m, C=CAr), 1510 (F, C=CAr), 1442 (f, CH₃), 1272 (F, C-O), 1232 (f, C-O) cm⁻¹. **¹H-RMN (CDCl₃)** δ: 2,13 (3H, s, COCH₃), 3,59 (2H, s, H7), 3,88 (3H, s, OCH₃), 6,68 (1H, d, *J*= 8,1 Hz, H5/6), 6,77 (1H, s, H2), 6,68 (1H, d, *J*= 8,2 Hz, H5/6) ppm. **¹³C-RMN (CDCl₃)** δ: 29,0 (COCH₃), 50,4 (C7), 55,9 (OCH₃), 110,8 (C2), 115,6 (C5), 120,9 (C6), 127,4 (C1), 145,7 (C4), 148,1 (C3), 206,7 (CO) ppm.

III.5.2 Preparação do composto (*R,S*)-2-metoxi-4-(2-metilaminopropil)fenol (**104**)

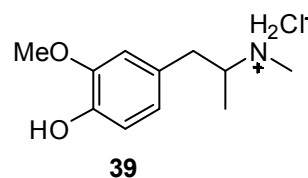
O produto (*R,S*)-2-metoxi-4-(2-metilaminopropil)fenol (**104**), foi obtido através do método geral em III.3.2., partindo de 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propa-2-ona (**68**), (1,6 g, 8,8 mmol), e foi obtido sob a forma de um óleo amarelo (1,2 g, 71 %). **¹H-RMN (CDCl₃)**



δ: 1,07 (3H, d, *J*= 6,2 Hz, H9), 2,39 (3H, s, NH-CH₃), 2,59-2,73 (2H, m, H7), 2,74-2,69 (1H, m, H8), 3,85 (3H, s, OCH₃), 6,45 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H5/6), 6,74 (1H, s, H2), 6,78 (1H, d, *J*= 8,2 Hz, H5/6).

III.5.3 Preparação do composto hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (**39**)

O hidrocloreto (*R,S*)-1-(3,4-dimetoxifenil)-*N*-metilpropan-2-amina (**39**), foi obtido através o método geral em III.2.3, partindo de (*R,S*)-2-metoxi-4-(2-metilaminopropil)fenol (**104**), (800 mg, 4,09 mmol), e apresenta-se sob a forma de cristais brancos (729,1 mg,

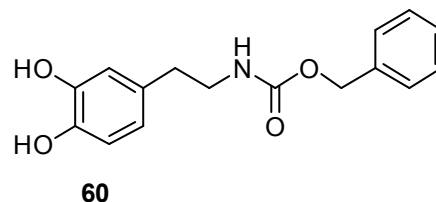


61 %). **¹H-RMN (D₂O)** δ: 1,11 (3H, d, *J*= 6,0 Hz, H9), 2,40 (3H, s, NH-CH₃), 2,57-2,67 (2H, m, H7), 2,79-2,82 (1H, m, H8), 3,86 (3H, s, OCH₃), 6,65 (1H, d, *J*= 8,0 Hz, H5/6), 6,74 (1H, s, H2), 6,78 (1H, d, *J*= 8,2 Hz, H5/6) ppm.

III.6 Preparação de derivados da dopamina

III.6.1 Preparação do composto *N*-benziloxycarbonil-3,4-dihidroxifeniletilamina (60)

A uma solução de hidrocloreto de dopamina (**1**) (1,00 g, 5,3 mmol) em THF:H₂O (1:1, 20 mL) adicionou-se NaOH (0,5 g, 11,6 mmol). A mistura foi arrefecida a 0°C e adicionou-se gota a gota clorofornato de benzilo (1,0 mL, 7,4 mmol). A reacção permaneceu sob agitação em



banho de gelo durante 3 h, sendo seguida por c.c.f. (CH₂Cl₂/MeOH 9:1; pulverização com ácido fosfomolibdico R_f : 0,78). No final adicionou-se água (20 mL), e extraiu-se com EtOAc (3× 50 mL). Recolheu-se a fase orgânica, secou-se com NaSO₄, filtrou-se e concentrou-se. O resíduo foi purificado por c.c. “flash” (CH₂Cl₂/MeOH 98:2), tendo-se obtido o produto (**60**) sob a forma de um sólido branco (1,4 g, 89 %). **P.f.**: 133-135 °C (Lit 133,5-134,0 °C).¹³⁵ **IV (KBr)**, ν_{\max} : 3479 (F, OH), 3338 (F, OH), 3025 (f, N-H) 1686 (F, C=O). **¹H-RMN (CDCl₃)** δ : 2,69 (2H, t, J = 6,4 Hz, H7), 3,40-3,42 (2H, m, H8), 5,09 (2H, s, Cbz-CH₂), 6,59 (1H, d, J = 7,2 Hz, H6), 6,68 (1H, s, H2), 6,78 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5), 7,34 (5H, s, Cbz-HAr) ppm. **¹³C-RMN (CDCl₃/DMSO)** δ : 35,2 (C7), 42,2 (C8), 66,3 (Cbz-CH₂), 115,3 (C5), 115,6 (C2), 120,2 (C6), 127,9 (Cbz-CAr), 128,3 (Cbz-CAr), 130,5 (C1), 136,6 (Cbz-CAr) 143,0 (C4), 144,5 (C3), 156,2 (CO) ppm. **MS-EI**: m/z : 287 [MH]⁺. **HRMS-ESI(+)** m/z calculado para C₁₆H₁₇NO₄ [M]⁺: 287,1158 obtido 287,1152. Os dados espectroscópicos do produto estão de acordo com os apresentados na literatura.¹¹⁵

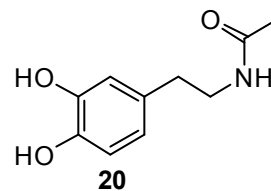
III.6.2 Preparação de derivados de CA acetilados

Técnica geral de acetilação

A uma solução de catecolamina (5,28 mmol) em DMF (23 mL), adicionou-se NaOAc (430 mg, 5,28 mmol) e Ac₂O (500 μ L, 5,29 mmol). A reacção permaneceu sob agitação durante 3h 30 min à t.a., sendo seguida por c.c.f. (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, pulverização com ácido fosfomolibdico). O solvente foi evaporado à securo e a mistura bruta purificada por c.c. “flash” (CH₂Cl₂/MeOH 9:1).

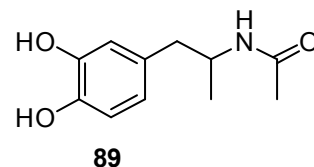
III.6.2.1 Síntese do composto *N*-acetildopamina (20)

O composto **20** foi sintetizado de acordo com a técnica geral de acetilação descrita em III.6.2, sendo obtido sob a forma de um sólido branco (0,80 g, 77 %). **P.f.:** 65–70 °C (Lit 78–80 °C).¹³⁶ **IV (KBr)**, ν_{\max} : 3391 (MF, OH), 1646 (m, C=O), 1557, 1435, 1373 (C=C), 1291 (C-O) cm^{-1} . **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,79 (3H, s, COCH₃), 2,55 (2H, t, J = 6,5 Hz, H7), 3,23 (2H, t, J = 6,5 Hz, H8), 6,57 (1H, d, J = 7,8 Hz, H6), 6,66 (1H, s, H2), 6,73 (1H, d, J = 8,0 Hz, H5) ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ : 22,1 (CH₃), 34,1 (C7), 41,1 (C8), 116,6 (C2/5), 116,9 (C2/5), 121,5 (C6), 132,5 (C1), 142,7 (C3/4), 144,2 (C3/4), 174,3 (CO) ppm. **MS (ESI)** m/z 218 [M + Na]⁺, 196 [MH]⁺, 154 [DAH]⁺. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.^{113, 114}



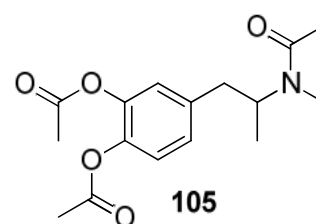
III.6.2.2 Síntese do composto *N*-acetil- α -metildopamina (89)

A reacção foi efectuada de acordo com a técnica geral de acetilação descrita em III.6.2, partindo de **38** (10 mg, 41 μmol). O composto foi purificado por c.c.f.p (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, R_f : 0,4), tendo-se obtido o produto **89** sob a forma de um óleo amarelo (7,4 mg, 45 %). **UV/vis, λ :** 231, 284 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,02 (3H, d, J = 6,8 Hz, H9), 1,77 (3H, s, COCH₃), 2,45 (1H, dd, J = 14,0 e 8,4 Hz, H7a), 2,61 (1H, dd, J = 14,0 e 5,6 Hz, H7b), 3,91 (1H, sx, J = 6,8 Hz, H8), 6,58 (1H, d, J = 7,6 Hz, H5/6), 6,67 (1H, s, H2), 6,74 (1H, d, J = 8,0 Hz, H5/6) ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ : 19,3 (C9), 21,8 (COCH₃), 40,7 (C7), 46,9 (C8), 115,9 (C5/6), 117,0 (C2), 121,6 (C5/6), 131,6 (C1), 142,2 (C3/4), 143,6 (C3/4), 172,9 (CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 232 [M + Na]⁺, 210 [MH]⁺. **HRMS-ESI** m/z calculado para C₁₁H₁₅NO₃ [MH]⁺: 210,1052 obtido 210,1129.



III.6.2.3 Síntese do composto *N*-acetil-di-*O*-acetil-*N*, α -dimetildopamina (105)

O composto foi sintetizado com alterações à técnica geral descrita em III.6.2. Utilizou-se **37** (30 mg, 114 μmol) e 3 eq. de NaOAc (29 mg, 341 μmol) e Ac₂O (36 μL , 341 μmol). A reacção foi seguida por c.c.f. (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, R_f : 0,6) e deixou-se sob agitação durante a noite à t.a. Evaporou-se à securo, e purificou-se o composto por



c.c.f.p (CH₂Cl₂/MeOH 9:1), tendo-se obtido *N*-acetil-di-*O*-acetil-*N*, α -dimetildopamina (**105**, tri-Ac-diMeDA), sob a forma de um óleo amarelo (17,5 mg, 50 %). **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,09 (3H, d, J = 6,8 Hz, H₉), 1,21 (3H, d, J = 6,4 Hz, H_{9'}), 1,60 (3H, s, N-COCH₃), 1,82 (3H, s, N-COCH_{3'}), 2,22 (12H, s, 2x O-COCH₃), 2,71-2,76 (10H, m, 2x H₇ + 2x N-CH₃), 4,09-4,15 (1H, m, H₈), ca. 4,70 (H_{8'}), 7,00-7,10 (6H, m, H₂/5/6). ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ : 16,7 (C₉), 17,8 (C_{9'}), 19,9 (O-COCH₃), 20,2 (N-COCH₃), 21,1 (N-COCH_{3'}), 26,7 (N-CH₃), 29,5 (N-CH_{3'}), 38,1 (C₇), 38,5 (C_{7'}), 50,2 (C_{8'}), 56,0 (C₈), 123,0 (C_{5/6}), 123,2 (C_{5'/6'}), 123,6 (C₂), 123,9 (C_{2'}), 127,9 (C_{5/6}), 128,1 (C_{5'/6'}), 138,6 (C₁), 138,7 (C_{1'}), 139,8 (C_{3/4}), 140,2 (C_{3/4'}), 141,1 (C_{3/4}), 141,4 (C_{3/4'}), 171,9 (ester-CO), 172,0 (ester-CO'), 172,1 (ester-CO), 172,2 (ester-CO'), 173,9 (amida-CO), 174,0 (amida-CO') ppm. **MS (ESI)** m/z : 330 [M + Na]⁺, 308 [MH]⁺. **HRMS-ESI** m/z calculado para C₁₆H₂₁NO₅ [MH]⁺: 308,1420 obtido 308,1475.

III.7 Preparação de conjugados de CA com nucleófilos de enxofre

III.7.1 Por oxidação enzimática de CA

Método geral A- A uma solução de CA (50 mg) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (100 mL) adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,5 mg, 2000 U). Verificou-se uma mudança de cor, de incolor para vermelho (DA) ou amarelo (NADA e DA-Cbz), indicando a formação da respectiva *o*-quinona. Adicionou-se 5 eq. do nucleófilo de enxofre (GSH, Cys ou NACys). A mistura reaccional permaneceu sob agitação à t.a. durante 3 h. No final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 % (excepto na GSH). A solução foi concentrada no evaporador rotativo e o produto purificado por cromatografia de fase reversa, RP-18. A sílica foi activada com água (100 mL) e utilizou-se o seguinte gradiente: água (200 mL), 10% Metanol (MeOH) (100 mL), 20% MeOH (50 mL) e por último 50% MeOH (50 mL) para lavar a coluna. A presença de aducto em cada fracção foi verificada usando o detector de UV/vis e as fracções que apresentaram máximos a ca. de 257 e 293 nm foram evaporadas à secura e purificadas no HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-FCT-1.

Método geral B- A uma solução de CA (12,5 mg) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (10 mL) adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,3 mg, 1250 U), e cisteína (5,0 eq.). A mistura reaccional ficou sob agitação à t. a. durante 2 h. Adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 % e evaporou-se à secura. Os compostos foram purificados no HPLC semi-preparativo usando o programa HPLC-IST-1.

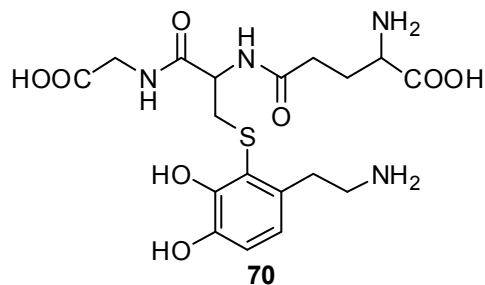
III.7.1.1 Reacção da dopamina com a glutatona

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral A descrito em III.7.1 e isolaram-se os produtos:

2-S-Glutatíonil-dopamina (70, 2-GSH-DA): foi

obtido sob a forma de um óleo amarelo (12,7 mg, 11 %) a $t_R = 7,3$ min. **UV/vis**, λ : 257 e 290 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,93 (2H, m, Glu-H β), 2,09 (2H, m, Glu-H γ),

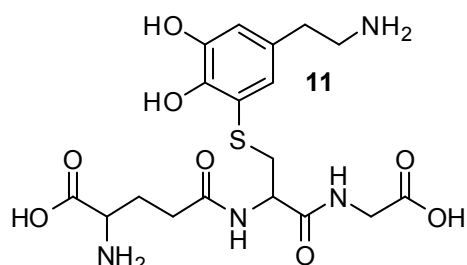
2,31-2,38 (2H, m, H7), 3,03-3,09 (3H, m, H8 + Cys-H β a), 3,15-3,22 (1H, m, Cys-H β b), 3,75 (2H, m, Gly-H α), 3,88-3,91 (1H, m, Glu-H α), 4,30-3,31 (1H, m, Cys-H α), 6,69 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H5), 6,80 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H6) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 25,7 (Glu-C β), 30,6 (Glu-C γ), 31,7 (C7), 35,2 (Cys-C β), 40,9 (C8), 41,4 (Glu-C α), 52,7 (Cys-C α), 54,1 (Gly-C α), 117,3 (C5), 118,9 (C2), 122,2 (C6), 132,9 (C1), 143,7 (C4), 146,9 (C3), 172,1 (CO), 172,7 (CO), 173,2 (CO), 174,5 (CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 459 $[\text{MH}]^+$. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



5-S-Glutatíonil-dopamina (11, 5-GSH-DA): foi iso-

lado sob a forma de um óleo amarelo com um rendimento de 78 % (94,2 mg) a $t_R = 8,7$ min. **UV/vis**, λ : 255 e 289 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,98-1,99 (2H, m, Glu-H β), 2,34 (2H, t, $J = 6,7$ Hz, Glu-H γ), 2,72 (2H, m, H7), 3,10-

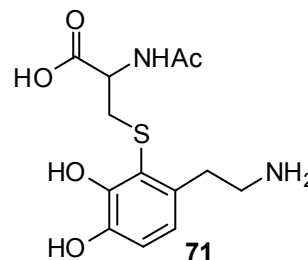
3,12 (3H, m, H8 + Cys-H β a), 3,23-3,27 (1H, m, Cys-H β b), 3,42-3,52 (2H, m, Gly-H α), 3,63-3,64 (1H, m, Glu-H α), 4,30 (1H, m, Cys-H α), 6,68 (1H, s, H6), 6,77 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 26,5 (Glu-C β), 31,8 (Glu-C γ), 32,3 (C7), 35,1 (Cys-C β), 40,9 (C8), 43,7 (Glu-C α), 53,6 (Cys-C α), 54,5 (Gly-C α), 117,1 (C2/6), 119,7 (C5), 126,0 (C2/6), 129,5 (C1), 144,4 (C4), 145,0 (C3), 171,8 (CO), 174,3 (CO), 175,1 (CO), 176,4 (CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 459 $[\text{MH}]^+$. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



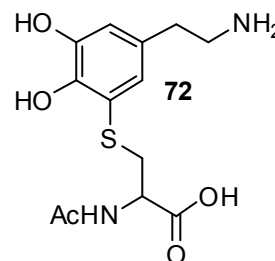
III.7.1.2 Reacção da dopamina com a *N*-acetil-cisteína

Da reacção da dopamina com a NAcCys realizada segundo o método geral A descrito em III.7.1, foram isolados os produtos:

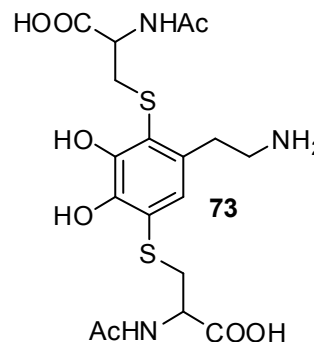
2-S-(*N*-Acetil)cisteínil-dopamina (71, 2-NAcCys-DA) sob a forma de um óleo amarelo (3,3 mg, 4 %) a $t_R = 8,9$ min. **UV/vis, λ :** 259 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,78 (3H, s, NAcCys-CH₃), 3,04-3,12 (5H, m, H7 + H8 + Cys-H β a), 3,30 (1H, dd, $J = 14,1$ e $3,4$ Hz, Cys-H β b), 4,27-4,28 (1H, m, Cys-H α), 6,71 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H5), 6,82 (1H, d, $J = 8,2$ Hz, H6) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O) δ :** 21,7 (NAcCys-CH₃), 31,4 (C7), 34,5 (Cys-C β), 40,6 (C8), 53,2 (Cys- α), 117,0 (C5), 117,9 (C2), 121,8 (C6), 132,5 (C1), 143,3 (C3/4), 146,6 (C3/4), 173,8 (NAcCys-CO), 174,3 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI) m/z :** 337 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 315 [MH]⁺. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



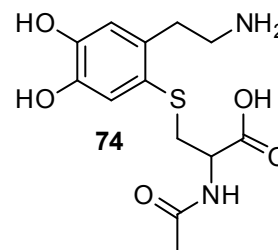
5-S-(*N*-Acetil)cisteínil-dopamina (72, 5-NAcCys-DA) sob a forma de um óleo amarelo (69,0 mg, 83 %) a $t_R = 10,1$ min. **UV/vis, λ :** 257 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,74 (3H, s, NAcCys-CH₃), 2,67 (2H, t, $J = 6,8$ Hz, H7), 2,94 (1H, dd, $J = 14,0$ e $8,1$ Hz, Cys-H β a), 3,06 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, H8), 3,22 (1H, dd, $J = 14,0$ e $3,2$ Hz, Cys-H β b), 4,09 (1H, dd, $J = 7,4$ e $3,5$ Hz, Cys-H α), 6,61 (1H, s, H6), 6,72 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O) δ :** 24,6 (NAcCys-CH₃), 34,8 (C7), 39,0 (Cys-C β), 43,4 (C8), 57,5 (Cys-C α), 119,4 (C2/6), 123,2 (C5), 128,5 (C2/6), 132,0 (C1), 146,5 (C4), 147,3 (C3), 176,3 (NAcCys-CO), 179,3 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI) m/z :** 353 [$\text{M} + \text{K}$]⁺, 315 [MH]⁺. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



2,5-S,S-di-(*N*-Acetil)cisteínil-dopamina (73, 2,5-NAcCys-DA) sob a forma de um óleo amarelo em quantidades vestigiais. **UV/vis, λ :** 273 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,80 (3H, s, NAcCys-CH₃ ou NAcCys-CH₃'), 1,83 (3H, s, NAcCys-CH₃' ou NAcCys-CH₃), 3,05-3,18 (6H, m, H7 + H8 + Cys-H β a + Cys-H β 'a), 3,30 (1H, dd, $J = 14,2$ e $3,2$ Hz, Cys-H β b ou Cys-H β 'b), 3,36 (1H, dd, $J = 14,0$ e $3,8$ Hz, Cys-H β 'b ou Cys-H β b), 4,32-4,33 (2H, m, Cys-H α + Cys-H α '), 6,91 (1H, s, H6) ppm. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



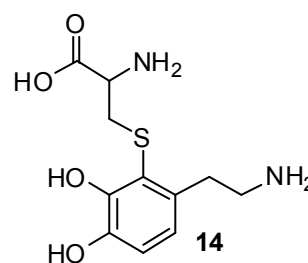
6-S-(N-Acetil)-cisteínil-dopamina (74, 6-NACys-DA) obtido sob a forma de um óleo amarelo, em quantidade residual. **UV/vis, λ :** 252 e 288 nm. **$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 1,80 (3H, s, NAcCys-CH₃), 2,91-2,99 (2H, m, H7), 3,06-3,12 (2H, m, H8), 3,22 (1H, dd, J = 14,7 e 4,2 Hz, Cys-H β a), 3,31 (1H, dd, J = 14,2 e 3,3 Hz, Cys-H β b), 4,37 (1H, m, Cys-H α), 6,76 (1H, s, H5), 7,01 (1H, s, H2) ppm.



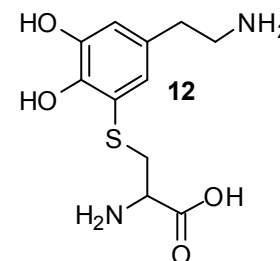
III.7.1.3 Reacção da dopamina com a cisteína

A reacção foi levada a cabo de acordo com o método geral A descrito em III.7.1, e foram recolhidos os aductos:

2-S-Cisteínil-dopamina (14, 2-Cys-DA) isolado sob a forma de um óleo castanho (5,8 mg, 8 %) a t_R = 5,9 min. **UV/vis, λ :** 255 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 2,95-3,29 (6H, m, Cys-H β + H8 + H7), 3,94 (1H, t, J = 5,6 Hz, Cys-H α), 6,73 (1H, d, J = 8,2 Hz, H5), 6,86 (1H, d, J = 8,2 Hz, H6) ppm. **$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 33,7 (C7), 37,7 (Cys-C β), 42,9 (C8), 55,4 (Cys-C α), 119,9 (C5), 120,4 (C2), 124,6 (C6), 135,4 (C1), 144,9 (C3/4), 149,4 (C3/4), 173,4 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI) m/z :** 273 [MH]⁺.



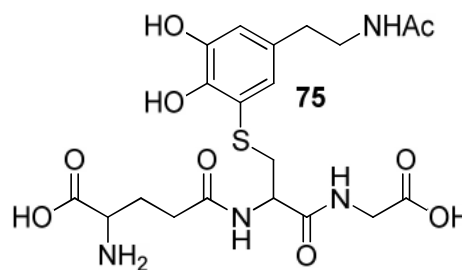
5-S-Cisteínil-dopamina (12, 5-Cys-DA) obtido sob a forma de um óleo amarelo com um rendimento de 82 % (57,9 mg) a t_R = 6,9 min. **UV/vis, λ :** 255 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 2,87 (2H, t, J = 6,9 Hz, H7), 3,23 (2H, t, J = 6,6 Hz, H8), 3,43 (1H, dd, J = 15,1 e 4,1 Hz, Cys-H β a), 3,54 (1H, dd, J = 15,1 e 6,3 Hz, Cys-H β b), 4,20 (1H, t, J = 5,1 Hz, Cys-H α), 6,88 (1H, s, H6), 6,99 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 31,3 (C7), 33,2 (Cys-C β), 39,9 (C8), 51,5 (Cys-C α), 116,9 (C2/6), 117,6 (C5), 126,0 (C2/6), 128,7 (C1), 144,2 (C3/4), 169,6 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI) m/z :** 311 [M + K]⁺, 273 [MH]⁺. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.¹¹



III.7.1.4 Reacção da *N*-acetildopamina com a glutatona

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral A descrito em III.7.1, partindo de 10 mg de NADA. Foi isolado o composto **5-S-glutatíonil-*N*-acetildopamina (75, 5-GSH-NADA)** sob a forma de um óleo amarelo (21,1 mg, 83 %) a $t_R = 11,1$ min.

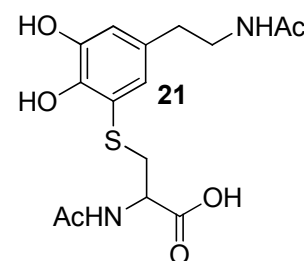
UV/vis, λ : 256 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 1,80 (3H, s,



COCH_3), 2,06 2,07 (2H, m, Glu-H β), 2,34 (2H, t, $J = 7,2$ Hz, Glu-H γ), 2,54 (2H, t, $J = 6,4$ Hz, H7), 3,08 (1H, dd, $J = 14,3$ e $8,4$ Hz, Cys-H $\beta\alpha$), 3,23 (3H, dd, $J = 14,3$ e $8,4$ Hz, H8 + Cys-H $\beta\beta$), 3,75 (2H, m, Gly-H α), 3,94 (1H, t, $J = 6,4$ Hz, Glu-H α), 4,32 (1H, dd, $J = 7,3$ e $4,8$ Hz, Cys-H α), 6,66 (1H, s, H6), 6,74 (1H, s, H2). **$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 22,2 (COCH_3), 25,8 (Glu-C β), 31,3 (Glu-C γ), 34,0 (C7), 35,2 (Cys-C β), 40,9 (C8), 41,4 (Gly-C α), 52,7 (Glu-C α), 53,6 (Cys-C α), 117,3 (C2/6), 119,4 (C5), 126,0 (C2/6), 132,4 (C1), 143,6 (C3/4), 144,6 (C3/4), 171,9 (Glu-CO), 172,8 (Cys-CO), 173,2 (Gly-CO), 174,3 (NADA-CO), 174,4 (Glu-CO). **MS (ESI)** m/z : 539 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 501 $[\text{MH}]^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}$ $[\text{MH}]^+$: 501,1655 obtido 501,1650.

III.7.1.5 Reacção da *N*-acetildopamina com a *N*-acetil-cisteína

Na reacção efectuada pelo método geral A descrito em III.7.1, na presença de 10 mg de NADA, foi isolado o composto, **5-S-(*N*-acetil)cisteínil-*N*-acetildopamina (21, 5-NAcCys-NADA)** sob a forma de um óleo amarelo (14,4 mg, 79 %). **UV/vis, λ :** 255 e 293

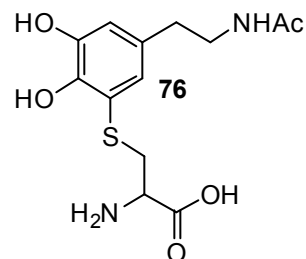


nm. **$^1\text{H-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 1,74 (3H, s, COCH_3), 1,81 (3H, s, NAcCys- CH_3), 2,53 (2H, t, $J = 6,3$ Hz, H7), 2,93 (1H, dd, $J = 13,8$ e $8,1$ Hz,

Cys-H $\beta\alpha$), 3,24-3,28 (3H, m, Cys-H $\beta\beta$ + H8), 4,28 (1H, dd, $J = 7,2$ e $3,4$ Hz, Cys-H α), 6,63 (1H, s, H6), 6,74 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN (D}_2\text{O)}$** δ : 22,1 (NADA/NAcCys- COCH_3), 22,2 (NADA/NAcCys- COCH_3), 34,0 (C7), 36,5 (Cys-H β), 40,9 (C8), 55,5 (Cys-H α), 117,0 (C2/6), 120,6 (C5), 126,0 (C2/6), 132,4 (C1), 143,4 (C4), 144,6 (C3), 173,9 (NADA-CO), 174,3 (NAcCys-CO), 176,3 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 395 $[\text{M} + \text{K}]^+$. Os dados espectroscópicos do produto obtido estão de acordo com os apresentados na literatura.³⁵

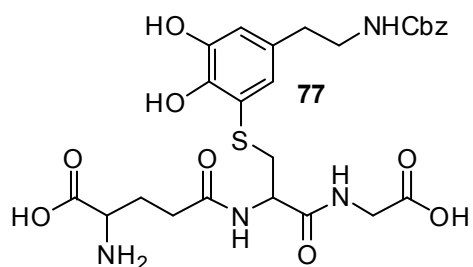
III.7.1.6 Reacção da *N*-acetildopamina com a cisteína

A reacção foi realizada segundo o método geral A descrito em III.7.1, na presença de 20 mg de NADA. Foi isolado o aducto **5-S-cisteínil-*N*-acetildopamina (76, 5-Cys-NADA)** sob a forma de um óleo amarelo e com rendimento de 72 % (23,0 mg) a $t_R = 9,1$ min. **UV/vis**, λ : 255 e 290 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,80 (3H, s, COCH_3), 2,52 (2H, t, $J = 6,7$ Hz, H7), 3,23 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H8), 3,26-3,34 (2H, m, Cys- $\text{H}\beta$), 3,94 (1H, dd, $J = 4,6$ e $2,3$ Hz, Cys- $\text{H}\alpha$), 6,69 (1H, s, H2/6), 6,79 (1H, s, H2/6). **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 22,1 (COCH_3), 34,1 (C7), 34,8 (Cys-C β), 40,9 (C8), 52,9 (Cys-C α), 117,9 (C2/6), 118,4 (C5), 126,5 (C2/6), 132,7 (C1), 143,9 (C3/4), 144,7 (C3/4), 171,0 (Cys-CO), 174,2 (NADA-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 353 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$, 337 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 315 [MH] $^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ [MH] $^+$: 315,1015 obtido 315,1009.



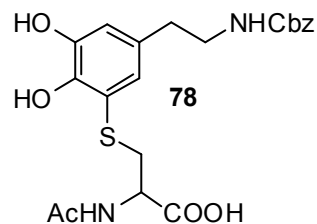
III.7.1.7 Reacção da *N*-benziloxycarbonildopamina com a glutatona

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral A descrito em III.7.1, na presença de DA-Cbz (10 mg) dissolvida em THF (1 mL). Foi isolado o composto **5-S-glutathionil-*N*-benziloxycarbonildopamina (77, 5-GSH-DA-Cbz)** como um óleo azul (13,1 mg, 63 %). **UV/vis**, λ : 254 e 290 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 2,03-2,05 (2H, m, Glu- $\text{H}\beta$), 2,36 (2H, t, $J = 6,9$ Hz, Glu- $\text{H}\gamma$), 2,54 (2H, m, H7), 3,01 (1H, dd, $J = 14,0$ e $8,6$ Hz, Cys- $\text{H}\beta\alpha$), 3,14 (1H, dd, $J = 14,0$ e $3,8$ Hz, Cys- $\text{H}\beta\beta$), 3,26 (2H, t, $J = 5,8$ Hz, H8), 3,71 (2H, s, Gly- $\text{H}\alpha$), 3,92 (1H, t, $J = 6,3$ Hz, Glu- $\text{H}\alpha$), 4,29 (1H, dd, $J = 7,6$ e $5,2$ Hz, Cys- $\text{H}\alpha$), 4,92 (2H, s, Cbz- CH_2), 6,66 (1H, s, H6), 6,73 (1H, s, H2), 7,11 (2H, d, $J = 5,1$ Hz, Cbz-HAr), 7,26-7,28 (3H, m, Cbz-HAr) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 25,8 (Glu-C γ), 31,3 (Glu-C β), 34,7 (C7), 35,2 (Cys-C β), 41,4 (Gly-C α), 41,8 (C8), 52,7 (Glu-C α), 53,5 (Cys-C α), 66,8 (Cbz- CH_2), 117,5 (C2/6), 119,2 (C5), 126,2 (C2/6), 127,4 (Cbz-CAr), 128,5 (Cbz-CAr), 129,1 (Cbz-CAr), 132,4 (C1), 137,1 (Cbz-CAr), 143,5 (C4), 144,5 (C3), 158,6 (Cbz-CO), 172,0 (Glu-CO), 172,6 (Gly-CO), 173,1 (Cys-CO) 174,3 (Gly-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 631 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$, 594 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 593 [MH] $^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$ [MH] $^+$: 593,1917 obtido 593,1908.



III.7.1.8 Reacção da *N*-benziloxicarbonildopamina com a *N*-acetil-cisteína

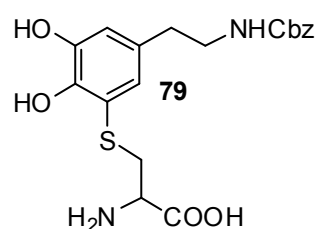
Na reacção executada pelo método geral A descrito em III.7.1, na presença de 20 mg de DA-Cbz dissolvida em THF (2 mL), foi isolado o aducto **5-S-(*N*-acetil)cisteínil-*N*-benziloxicarbonildopamina (78, 5-NACys-DACbz)** sob a forma de um óleo violeta com 36 % (11,1 mg). **UV/vis, λ :** 257 e 293 nm.



$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ : 1,68 (3H, s, NAcCys- CH_3), 2,50 (2H, s, H7), 2,93 (1H, dd, J = 13,8 e 7,9 Hz, Cys-H β a), 3,19-3,23 (3H, m, H8 + Cys-H β b), 4,13-4,14 (1H, m, Cys-H α), 4,88 (2H, s, Cbz- CH_2), 6,61 (1H, s, H6), 6,70 (1H, s, H2), 7,12 (2H, d, J = 5,8 Hz, Cbz-HAr), 7,24 (3H, m, Cbz-HAr) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 22,1 (NAcCys- CH_3), 34,6 (C7), 36,4 (Cys-C β), 41,8 (C8), 55,3 (Cys-C α), 66,9 (Cbz- CH_2), 117,2 (C2/6), 120,5 (C5), 126,3 (C2/6), 127,7 (Cbz-CAr), 128,6 (Cbz-CAr), 129,1 (Cbz-CAr), 132,38 (C1), 137,0 (Cbz-CAr), 143,3 (C4), 144,5 (C3), 158,6 (Cbz-CO), 173,7 (NAcCys-CO), 176,7 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 487 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$, 471 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 471,1202 obtido 471,1196.

III.7.1.9 Reacção da *N*-benziloxicarbonildopamina com a cisteína

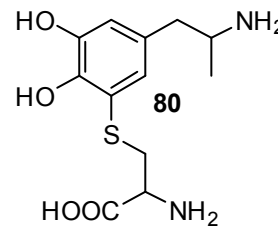
A reacção foi realizada segundo o método geral A descrito em III.7.1, na presença de 20 mg de DA-Cbz dissolvida em THF (2 mL). Isolou-se o aducto **5-S-cisteínil-*N*-benziloxicarbonildopamina (79, 5-CyS-DACbz)** como um óleo violeta (14,2 mg, 50 %). **UV/vis, λ :** 254 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)**



δ : 2,53 (2H, m, H7), 3,14 (1H, dd, J = 14,8 e 8,3 Hz, Cys-H β a), 3,29-3,38 (2H, m, H8 + Cys-H β b), 3,82 (1H, dd, J = 7,5 e 4,0 Hz, Cys-H α), 4,96 (2H, s, Cbz- CH_2), 6,73 (1H, s, H6), 6,84 (1H, s, H2), 7,18 (2H, d, J = 5,8 Hz, Cbz-HAr), 7,34 (3H, t, J = 7,2 Hz, Cbz-HAr) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 34,7 (C7), 35,0 (Cys-C β), 41,8 (C8), 53,2 (Cys-C α), 66,9 (Cbz- CH_2), 118,1 (C2/6), 118,5 (C5), 126,7 (C2/6), 127,6 (Cbz-CAr), 128,6 (Cbz-CAr), 129,1 (Cbz-CAr), 132,7 (C1), 137,1 (Cbz-CAr), 143,8 (C4), 144,7 (C3), 158,7 (Cbz-CO), 173,7 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 445 [$\text{M} + \text{K}$] $^+$, 429 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$, 407 [MH] $^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ [MH] $^+$ 407,1277 obtido 407,1271.

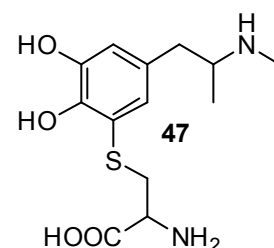
III.7.1.10 Reacção da α -metildopamina com a cisteína

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral B descrito em III.7.1, e isolou-se o produto **5-S-cisteínil- α -metildopamina (80, 5-Cys-MeDA)**, sob a forma de um óleo castanho (8,1 mg, 55 %) com $t_R = 5$ min. **UV/vis**, λ : 253 e 294 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,20 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H9), 2,64-2,77 (2H, m, H7), 3,16-3,23 (1H, m, Cys-H β a), 3,32 (1H, dd, $J = 14,8$ e 3,7 Hz, Cys-H β b), 3,45-3,51 (1H, m, H8), 3,70 (1H, dd, $J = 7,1$ e 3,7 Hz, Cys-H α), 6,72 (1H, s, H6), 6,87 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 17,6 (C9), 35,0 (Cys-C β), 39,2 (C7), 49,0 (C8), 53,5 (Cys-C α), 117,6 (C6), 119,1 (C5), 126,4 (C2), 128,9 (C1), 144,1 (C3/4), 144,7 (C3/4), 172,2 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 287 $[\text{MH}]^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{MH}]^+$: 287,0907 obtido 287,1073.



III.7.1.11 Reacção da N,α -dimetildopamina com a cisteína

A reacção do composto diMeDA (**37**), (12 mg), com a cisteína foi realizada segundo o método geral B descrito em III.7.1. Obteve-se o aducto **5-S-cisteínil- N,α -dimetildopamina (47, 5-Cys-diMeDA)** sob a forma óleo castanho (2,5 mg, 18 %) a $t_R = 5$ min. **UV/vis**, λ : 253 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,18 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, H9), 2,60 (3H, s, N-CH $_3$), 2,71 (1H, dd, $J = 14,0$ e 7,2 Hz, H7a), 2,82 (1H, dd, $J = 12,0$ e 6,8 Hz, H7b), 3,19 (1H, dd, $J = 14,8$ e 8,0 Hz, Cys-H β a), 3,33 (1H, dd, $J = 14,8$ e 4,0 Hz, Cys-H β b), 3,38-3,41 (1H, m, H8), 3,69 (1H, dd, $J = 7,6$ e 4,0 Hz, Cys-H α), 6,74 (1H, s, H6), 6,89 (1H, s, H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 14,8 (C9), 29,9 (N-CH $_3$), 35,1 (Cys-C β), 37,9 (C7), 53,6 (Cys-C α), 56,3 (C8), 117,6 (C6), 119,2 (C5), 126,4 (C2), 128,4 (C1), 144,4 (C3/4), 144,8 (C3/4), 172,3 (Cys-CO) ppm. **MS (ESI)** m/z : 301 $[\text{MH}]^+$. **HRMS-ESI** m/z calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ $[\text{MH}]^+$: 301,1144 obtido 301,1205. Os dados espectroscópicos do produto estão de acordo com os apresentados na literatura.⁵⁵



III.7.2 Por oxidação química de CA

Reacções com NaIO_4 e Sal de Frémy

Método geral A - Preparou-se uma solução de CA (51 μmol) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (50 mL). De seguida, pesou-se 1 eq. de NaIO_4 ou de Sal de Frémy, este último sob

atmosfera inerte, e adicionou-se à solução anteriormente preparada. Verificou-se uma alteração de cor na mistura reaccional, indicando a formação da o-quinona. Adicionou-se o nucleófilo de enxofre GSH, NAcCys ou Cys (5 eq.), e controlou-se a reacção no HPLC analítico, com o programa HPLC-IST-2. A mistura reaccional permaneceu sob agitação à t.a. durante 3 h. No final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 %, e evaporou-se à secura. O produto foi purificado por cromatografia de fase reversa, RP-18, a sílica foi activada com água (100 mL) e utilizou-se o seguinte gradiente: água (100 mL), 10% MeOH (100 mL), 20% MeOH (100 mL) e 50% MeOH (100 mL). Foram recolhidas 4 fracções, correspondentes a cada gradiente utilizado. As fracções foram concentradas no evaporador rotativo e a presença de aducto foi verificada no HPLC analítico, com o programa HPLC-IST-2. As fracções que apresentaram máximos a ca de 257 e 293 nm foram purificadas no HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-IST-1.

Reacções com Ag₂O

Método geral B - A uma solução de CA (154 µmol) em 6 mL de DMF adicionou-se 10 eq. de Ag₂O. A cor da solução modificou-se para amarelo ou vermelho, dependendo da o-quinona formada. Colocou-se a mistura reaccional no vortex durante 5 min. Retirou-se a o-quinona e adicionou-se gota a gota a uma solução de nucleófilo de enxofre GSH, NAcCys ou Cys (5 eq.), em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (30 mL). A reacção foi mantida sob agitação à t.a. durante 3 h, no final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 %. Concentrou-se a mistura bruta sob pressão reduzida, e adicionou-se tolueno de modo a co-evaporar a DMF. Os compostos foram purificados utilizando o programa HPLC-IST-1.

III.7.2.1 Reacção da DA, NADA e DA-Cbz com nucleófilos de enxofre

Na Tabela III.1, estão apresentadas as reacções efectuadas com as CA, DA, NADA e Da-Cbz e os nucleófilos de enxofre GSH, Cys e NAcCys. Foram utilizados os agentes oxidantes NaIO₄, Sal de Frémy segundo o método geral A descrito em III.7.2, e Ag₂O segundo o método geral B descrito em III.7.2. São ainda apresentadas as condições experimentais e os resultados obtidos. Os compostos com características espectroscópicas de produtos anteriormente descritos, serão remetidos para os mesmos, e os compostos novos estão caracterizados a seguir à Tabela III.1.

Tabela III.1 - Reacções de oxidação química das CA, com nucleófilos de enxofre. Condições experimentais e resultados obtidos segundo os métodos gerais A (reacção com NaIO₄ ou Sal de Frémy) e B (reacção com Ag₂O), descritos em III.7.2.

Ensaio	CA (mg/μmol)	Ox./Nuc.	Produtos identificados (mg/η %)
A	DA (10,0/53)	NaIO ₄ /GSH	5-GSH-DA (1,7/7) ver III.7.1.1
B	DA (10,0/53)	NaIO ₄ /NACys	5-NACys-DA (1,8/11) ver III.7.1.2
C	DA (10,9/57)	Sal de Frémy/GSH	-*
D	DA (11,5/60)	Sal de Frémy/NACys	5-NACys-DA (0,2/1) dímero NACys (2,3)
E	DA (10,6/56)	Sal de Frémy/Cys	-*
F	DA (50/264)	Ag ₂ O NACys	5-NACys-DA (2,0/2) descrito em III.7.1.2
G	NADA (10,6/54)	NaIO ₄ /GSH	2-GSH-NADA (1,7/6) 5-GSH-NADA (4,7/17) descrito em III.7.1.4 2,5-GSH-NADA (4,4/10) dímero GSH (46,5)
H	NADA (14,7/75)	NaIO ₄ /NACys	5-NACys-NADA (1,6/6) descrito em III.7.1.5 2,5-NACys-NADA (2,3/2) dímero NACys (18,4)
I	NADA (12,3/60)	NaIO ₄ /Cys	5-Cys-NADA (0,7/4), descrito em III.7.1.6 dímero Cys (46,2)
J	NADA (11,2/57)	Sal de Frémy/GSH	5-GSH-NADA (3,0/11) dímero GSH**
L	NADA (7,5/38)	Sal de Frémy/NACys	5-NACys-NADA (3,2/24) dímero NACys
M	NADA (11,2/57)	Sal de Frémy/Cys	5-Cys-NADA (0,6/3) 2,5-Cys-NADA (0,4/2)
N	NADA (30/154)	Ag ₂ O/NACys	5-NACys-NADA (1,5/3)
O	DA-Cbz (10,0/36)	NaIO ₄ /GSH	5-GSH-DACbz (2,8/13) descrito em III.7.1.7

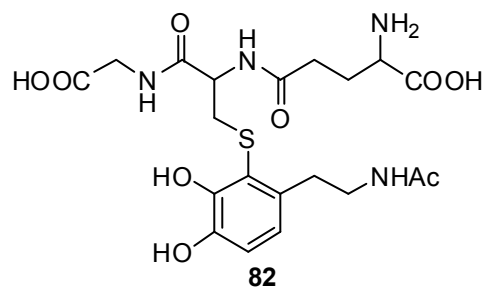
-* A presença de aducto não foi detectada no HPLC analítico (programa HPLC-IST-2)

- ** Composto identificado por ESI.

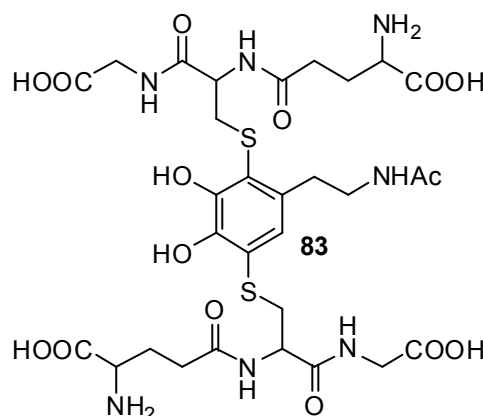
III.7.2.1.1 Caracterização dos compostos, apresentados na Tabela III.1:

Ensaio G (Tabela III.1):

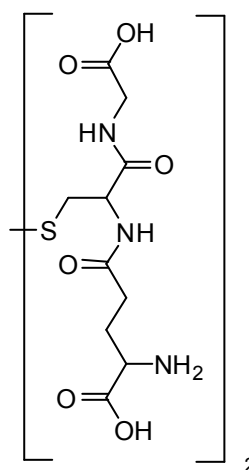
2-S-Glutatíonil-N-acetildopamina (82, 2-GSH-NADA): o aducto foi isolado sob a forma de um óleo verde (1,7 mg, 6 %). **UV/vis**, λ : 256 e 293 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,81 (3H, s, COCH₃), 1,90-2,19 (2H, m, Glu-H β), 2,34-2,38 (2H, m, Glu-H γ), 2,70-3,38 (6H, m, Cys-H β + H7 + H8), 3,62-3,89 (3H, m, Glu-H α + Gly-H α), 4,24-4,25 (1H, m, Cys-H), 6,85 (1H, d, J = 8,0 Hz, H5), 6,84 (1H, d, J = 8,4 Hz, H6) ppm. **MS (ESI)** m/z : 501 [MH]⁺.



2,5-S,S-di-(Glutatíonil)-N-acetildopamina (83, 2,5-GSH-NADA): obteve-se o composto sob a forma de um óleo verde (4,4 mg, 11 %). **UV/vis**, λ : 275 e 304 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 1,80 (3H, s, COCH₃), 2,00-2,06 (4H, m, Glu-H β + Glu-H β'), 2,34-2,44 (4H, m, Glu-H γ + Glu-H γ'), 2,75-3,31 (8H, m, Cys-H β + Cys-H β' + H7 + H8), 3,73-3,88 (6H, m, Glu-H α + Glu-H α' + Gly-H α + Gly-H α'), 4,19 (1 H, dd, J = 8,8 e 4,4 Hz, Cys-H α ou Cys-H α'), 4,31 (1 H, dd, J = 8,4 e 4,8 Hz, Cys-H α' ou Cys-H α), 6,85 (1H, s, H6) ppm. **MS (ESI)** m/z : 828 [M + Na]⁺, 806 [MH]⁺.



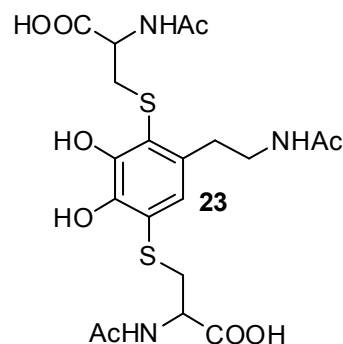
Dímero da GSH (84): obteve-se o composto sob a forma de um óleo incolor (46,5 mg). **¹H-RMN (D₂O)** δ : 2,07 (4H, q, J = 7,2 Hz, Glu-H β + Glu-H β'), 2,40-2,49 (4H, m, Glu-H γ + Glu-H γ'), 2,88 (2H, dd, J = 14,4 e 9,2 Hz, Cys-H β a + Cys-H β' a), 3,18 (2H, dd, J = 14,0 e 4,8 Hz, Cys-H β b + Cys-H β' b), 3,75 (2H, t, J = 6,4 Hz, Glu-H α + Glu-H α'), 3,89 (4H, s, Gly-H α + Gly-H α'), ca. 4,70 (Cys-H α + Cys-H α') ppm. **MS (ESI)** m/z : 613 [MH]⁺. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



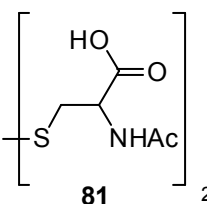
84

Ensaio H (Tabela III.1)

2,5-S,S-di-(N-Acetilcisteínil)-N-acetildopamina (23, 2,5-NAcCys-NADA): obteve-se o composto sob a forma de um óleo verde (2,3 mg, 2 %). **UV/vis, λ :** 274 e 304 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,78-1,80 (9H, s, COCH_3 + NACys-CH_3 + $\text{NACys-CH}_3'$), 2,61 (2H, t, $J = 6,6$ Hz, H7), 2,84-3,40 (6H, m, $\text{Cys-H}\beta$ + $\text{Cys-H}\beta'$ + H8), 4,22-4,28 (2 H, m, $\text{Cys-H}\alpha$ + $\text{Cys-H}\alpha'$), 6,85 (1H, s, H6) ppm. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.³⁵

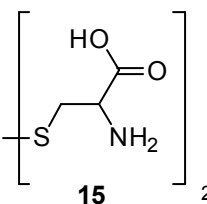


Dímero da NAcCys (81): obteve-se o composto sob a forma de um óleo incolor (18,4 mg). **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,98 (6H, s, NACys-CH_3), 2,95 (2H, dd, $J = 14,4$ e $8,4$ Hz, $\text{Cys-H}\beta\text{a}$ + $\text{Cys-H}\beta'\text{a}$), 3,23 (2H, dd, $J = 15,6$ e $4,4$ Hz, $\text{Cys-H}\beta\text{b}$ + $\text{Cys-H}\beta'\text{b}$), 4,70 (2H, dd, $J = 8,6$ e $4,4$ Hz, $\text{Cys-H}\alpha$ + $\text{Cys-H}\alpha'$) ppm. **MS (ESI) m/z :** 363 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 347 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 325 $[\text{MH}]^+$. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



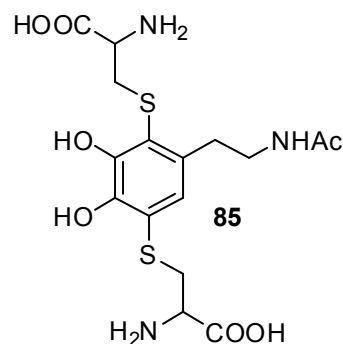
Ensaio I (Tabela III.1)

Dímero da Cys (15): obteve-se o composto sob a forma de um óleo incolor (46,2 mg). **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 3,44 (2H, dd, $J = 12,0$ e $6,4$ Hz, $\text{Cys-H}\beta\text{a}$ + $\text{Cys-H}\beta'\text{a}$), 3,54 (2H, dd, $J = 11,6$ e $4,0$ Hz, $\text{Cys-H}\beta\text{b}$ + $\text{Cys-H}\beta'\text{b}$), ca. 4,70 ($\text{Cys-H}\alpha$ + $\text{Cys-H}\alpha'$) ppm. Os dados espectroscópicos estão de acordo com os apresentados na literatura.³¹



Ensaio M (Tabela III.1)

2,5-S,S-di-(cisteínil)-N-acetildopamina (85, 2,5-Cys-NADA): obteve-se o composto sob a forma de um óleo castanho (0,4 mg, 2 %). **UV/vis, λ :** 271 e 302 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,84 (3H, s, COCH_3), 2,89-3,66 (12H, m, $\text{Cys-H}\beta$ + $\text{Cys-H}\beta'$ + $\text{Cys-H}\alpha$ + $\text{Cys-H}\alpha'$ + H7 + H8), 6,84 (1H, s, H6) ppm. **MS (ESI) m/z :** 472 $[\text{M} + \text{K}]^+$, 456 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 434 $[\text{MH}]^+$.



III.8 Preparação de conjugados de CA com nucleófilos de azoto

III.8.1 Por oxidação enzimática de CA

Método geral - A uma solução de CA (20 mg) em tampão fosfato (1 mL, pH 7,4, 50 mM) a 25 °C adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,2 mg; 1074 units), a solução mudou de cor, indicando a formação da *o*-quinona. De modo a remover a enzima colocou-se a mistura reaccional numa coluna *Hitrap™ desalting* (GE Healthcare®) e eluiu-se com água. As fracções foram analisadas por UV/vis, e aquelas que apresentaram máximos a ca. de 401 nm, comprimento de onda característico da *o*-quinona, foram juntas. A *o*-quinona foi adicionada gota a gota, a uma solução de nucleófilo de azoto, NAcHis ou Imid (10 eq.) em tampão fosfato (15 mL, pH 7,4, 50 mM). A mistura reaccional permaneceu sob agitação à t.a. durante 1 h. No final, adicionou-se 1 mL de ác. fórmico 88 % e evaporou-se à secura, tendo-se obtido um óleo laranja. Para retirar o excesso de nucleófilo realizou-se uma c.c. RP-18 usando o seguinte gradiente: H₂O (100 mL) e H₂O/MeOH (1:1) (100 mL). O produto foi concentrado no evaporador rotativo e purificado por HPLC semi-preparativo, com o programa HPLC-FCT-1.

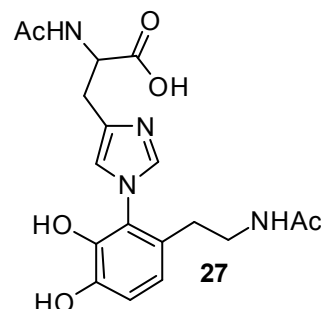
III.8.1.1 Reacção da *N*-acetildopamina com a *N*-acetil-histidina

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral descrito em III.8.1, e isolaram-se os produtos:

2-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-acetildopamina (27, 2-NACH-NADA) foi obtido sob a forma de um óleo amarelo obtido com um rendimento de 2 % (0,5 mg). **UV/vis, λ:** 283,5 nm. **¹H-RMN (D₂O)**

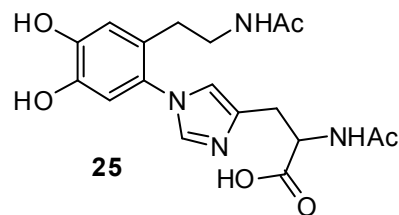
δ: 1,77, 1,78 (3H, s, NADA-COCH₃), 1,83, 1,84 (3H, s, NAcHis-COCH₃), 2,12-2,23, 2,39-2,42 (2H, m, H7), 2,74-2,99 (2H, m, NAcHis-Hβ), 3,01-3,14 (1H, m, H8), 4,28 (1H, dd, *J* = 8,6 e 5,2 Hz,

NAcHis-Hα), 4,38 (1H, dd, *J* = 8,2 e 4,7 Hz, NAcHis-Hα'), 6,81, 6,87 (1H, s, H6), 6,88 (1H, s, H5), 7,38, 7,41 (1H, s, NAcHis-H5), 8,76 (1H, s, NAcHis-H2) ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ: 22,6 (NADA-COCH₃ + NAcHis-CH₃), 26,1 (NAcHis-Cβ), 30,3 (C7), 40,7 (C8), 52,8 (NAcHis-Cα), 116,5 (C6), 118,5 (C5), 119,2 (NAcHis-C5), 123,1 (C1), 127,9 (C2), 131,5 (NAcHis-C4), 135,8 (NAcHis-C2), 143,6 (C3/4), 146,7 (C3/4), 163,6 (NAcHis-CO), 173,8 (NAcHis-COCH₃ + NADA-COCH₃) ppm. **MS (ESI) *m/z*:** 391 [MH]⁺.



6-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-acetildopamina (25, 6-NAcH-NADA) foi recolhido como um óleo amarelo (6,4 mg, 16 %).

UV/vis, λ : 286 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,78 (3H, s, NADA-COCH₃), 1,91 (3H, s, NAcHis-COCH₃), 2,36-2,44 (2H, m, H7), 3,05-3,15 (3H, m, H8 + NAcHis-H β a), 3,30 (1H, dd,

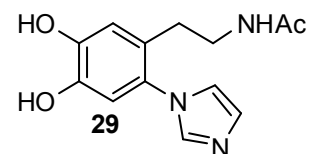


J = 15,4 e 5,0 Hz, NAcHis-H β b), ca. 4,70 (NAcHis-H α), 6,80 (2H, s, H2/5), 7,38 (1H, s, NAcHis-H5), 8,74 (1H, s, NAcHis-H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 22,1 (NADA-COCH₃ + NAcHis-CH₃), 26,8 (NAcHis-C β), 29,7 (C7), 39,9 (C8), 52,2 (NAcHis-C α), 114,7 (C5), 117,9 (C2), 123,5 (NAcHis-C5), 126,4 (C6), 127,5 (C1), 130,1 (NAcHis-C4), 135,9 (NAcHis-C2), 143,6 (C3/4), 146,6 (C3/4), 163,6 (NAcHis-CO), 173,4 (NAcHis-COCH₃), 174,3 (NADA-COCH₃) ppm. **MS (ESI)** m/z : 391 [MH]⁺.

III.8.1.2 Reacção da *N*-acetildopamina com o imidazole

A reacção foi realizada segundo o método geral descrito em

III.8.1. Foi isolado o aducto **6-(*N*-imidazol-*N*1'-il)-*N*-acetildopamina (29, 6-Imid-NADA)**, sob a forma de um óleo amarelo (4,0 mg, 15 %).



UV/vis, λ : 229 e 283,5 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 1,78 (3H, s, COCH₃), 2,45 (2H, t, J = 6,6 Hz, H7), 3,11 (3H, t, J = 6,5 Hz, H8), 6,84 (1H, s, H5), 6,85 (1H, s, H2), 7,54 (2H, s, Imid-H5/4), 8,82 (1H, s, Imid-H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ : 22,1 (COCH₃), 29,6 (C7), 40,1 (C8), 114,7 (C5), 117,8 (C2), 120,1 (Imid-C4/5), 124,4 (Imid-C4/5), 126,4 (C6), 127,6 (C1), 135,9 (Imid-C2), 143,5 (C3/4), 146,6 (C3/4), 174,3 (COCH₃) ppm. **MS (ESI)** m/z : 284 [M + Na]⁺, 262 [MH]⁺.

III.8.2 Por oxidação química de CA

Reacção com NaIO₄ e Sal de Frémy

Método geral A – Preparou-se uma solução de CA (5,5 mg, 1 eq.) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (10 mL), à qual se adicionou 1 eq. de NaIO₄ ou Sal de Frémy (pesado sob atmosfera inerte), e uma solução de 5 eq. nucleófilo de azoto (NAcHis ou Imid) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (2 mL). A reacção permaneceu sob agitação à t.a. durante 3 h, no final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico. Evaporou-se à securo e purificou-se utilizando o programa HPLC-IST-1.

Reacção com Ag₂O

Método geral B - A uma solução de NADA (102 µmol) em 6 mL de DMF adicionou-se 10 eq. de Ag₂O, verificando-se que a cor da solução mudou para amarela, típica da respectiva *o*-quinona. A mistura reaccional foi colocada no vortex durante 5 min, e de seguida retirou-se a *o*-quinona, à qual se adicionou gota a gota uma solução de NAcHis (5 eq.) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (30 mL). A reacção foi mantida sob agitação à t.a. durante 3 h. No final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 % e concentrou-se a mistura sob pressão reduzida, adicionando tolueno de modo a co-evaporar a DMF. Os aductos foram isolados utilizando o programa HPLC-IST-1, e estão apresentados na Tabela III.2.

III.8.2.1 Reacção da *N*-acetildopamina com a *N*-acetil-histidina e o imidazole

Na Tabela III.2, estão apresentadas as reacções efectuadas com NADA, como descrito na secção III.8.2, utilizando os oxidantes NaIO₄, Sal de Frémy e Ag₂O e nucleófilos NAcHis ou Imid. Assim como os aductos isolados, cujas características espectroscópicas serão remetidas para os anteriormente descritos.

Tabela III.2 - Reacções de oxidação química de NADA com NAcHis e Imid. Condições experimentais e resultados obtidos segundo os métodos gerais A (reacção com NaIO₄ ou Sal de Frémy) e B (reacção com Ag₂O), descritos em III.8.2.

Ensaio	NADA (mg/µmol)	Ox. (eq.)	Nuc. (eq.)	Compostos isolados (mg/η %) Caracterização
A	20/102	NaIO ₄	NAcHis (10)	6-NAcHis-NADA (4,0/10) ver III.8.1.1, pág 175
B	12/61	Sal de Frémy	NAcHis (5)	6-NAcHis-NADA (1,0/4)
C	20/102	Ag ₂ O	NAcHis (5)	6-NAcHis-NADA (0,8/2)
D	30/154	NaIO ₄	Imid (10)	6-Imid-NADA (4,0/10) ver III.8.1.2, pág 176

III.8.2.2 Reacção da *N*-acetil- α -metildopamina com a *N*-acetil-histidina

A reacção foi levada a cabo pelo método geral A exposto em III.8.2., utilizando NaIO₄ como oxidante. Foi isolado o composto

6-(*N*-acetil-histidin-*N*1'-il)-*N*-acetil- α -metildopamina (91, 6-NAcHis-Ac-MeDA) sob a forma de

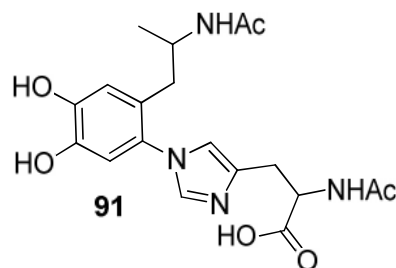
um óleo amarelo (0,5 mg, 5 %), com $t_R = 7,6$ min. **UV/vis**, λ :

284 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ : 0,99 (3H, d, $J = 7,1$ Hz, H9), 1,81

(3H, s, COCH₃), 1,99 (3H, s, NAcHis-COCH₃), 2,84 (2H, s, H7), 2,99 (2H, s, NAcHis-H β)

3,33 (1H, m, H8), 6,87 (2H, s, H2/5), 7,43 (1H, s, NAcHis-H5), 7,91 (1H, s, NAcHis-H5'), 8,80

(1H, s, NAcHis-H2), ppm. **MS (ESI)** m/z : 405 [MH]⁺.



III.8.2.3 Reacção da *N*, α -dimetildopamina com a *N*-acetil-histidina

A reacção foi realizada acordo com o método geral A apresentado em III.8.2, utilizando NaIO₄ e 10 eq. de NAcHis. Foi obtido o aducto **6-(*N*-acetil-**

histidin-*N*1'-il)-*N*-acetil-*N*, α -dimetildopamina (92, 6-

NAcHis-Ac-diMeDA) sob a forma de óleo amarelo (2 mg, 8

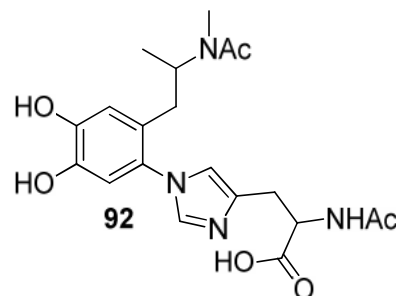
%) com $t_R = 8,8$ min. **UV/vis**, λ : 223, 284 nm. **¹H-RMN (D₂O)**

δ : 0,99-1,02 (3H, m, H9), 1,15 (3H, m, H9'), 1,89 (3H, s,

COCH₃), 1,97 (3H, s, NAcHis-COCH₃), 2,18 (2H, s, H7), 2,52

(2H, s, NAcHis-H β), 2,75 (1H, s, N-CH₃), 3,30 (1H, m, H8), 6,82 (2H, s, H2/5), 7,46 (1H, s,

NAcHis-H5), 8,74 (1H, s, NAcHis-H2) ppm. **MS (ESI)** m/z : 419 [MH]⁺.



III.9 Preparação de conjugados de CA com os aminoácidos valina, triptofano, *N*-acetil-lisina, lisina, serina e histidina

Na Tabela III.3 estão apresentadas as condições experimentais realizadas para as reacções das CA com os a.a. valina, triptofano, *N*-acetil-lisina, serina e histidina. Os compostos foram isolados no HPLC e analisados por ¹H-RMN e/ou ESI-MS.

Tabela III.3 - Condições experimentais nas reacções das CA com os aminoácidos valina, triptofano, *N*-acetil-lisina, serina e histidina.

Ensaio	CA (mg/ μ mol)	Método geral	Ox. (eq.)	Nuc. (eq.)
1	DA (10/53)	III.8.1 ^a	Ty	His (5)
2	DA (10/53)	III.8.1 ^a	Ty	Lys (5)
2'	DA (10/53)	A em III.8.2 ^b	NaIO ₄ (0,5)	Lys (5)
3	DA-Cbz (10/35)	A em III.8.2 ^b	NaIO ₄ (1,0)	His (5)
3'	DA-Cbz (10/35)	III.8.1 ^{a, b}	Ty	His (5) e (10)
4	NADA (10/51)	III.8.1 ^{a, b}	Ty	His (5)
4'	NADA (30/154)	A em III.8.2 ^b	NaIO ₄ (1,0)	His (10)
5	NADA (10/51)	III.8.1 ^{a, b}	Ty	NAcLys (5) e (10)
5'	NADA (10/51)	III.8.1	Ty	NAcLys (5)
5''	NADA (20/102)	A em III.8.2	NaIO ₄ (1,0)	NAcLys (5)
5'''	NADA (10/51)	A em III.8.2 ^c	NaIO ₄ (1,0)	NAcLys (5)
6	NADA (20/102)	A em III.8.2	NaIO ₄ (1,0)	Lys (5)
6'	NADA (10/51)	III.8.1 ^{a, b}	Ty	Lys (5)
7	NADA (11/56)	A em III.8.2	NaIO ₄ (1,0)	Ser (5)
8	NADA (10/51)	A em III.8.2	NaIO ₄ (1,0)	Val* (5)
8'	NADA (10/51)	III.8.1	Ty	Val* (5)
9	NADA (20/102)	A em III.8.2	NaIO ₄ (1,0)	Trp (5)
9'	NADA (20/102)	III.8.1	Ty	Trp (5)
9''	NADA (11/56)	A em III.8.2	Sal de Frémy (1,0)	Trp (5)

^a Não se removeu a enzima ^b Purificação segundo o método geral em III.8.1.

^c Utilizou-se H₂O como solvente * Hidroclorato de valinato de etilo

Nestes ensaios não foi possível identificar inequivocamente nenhum aducto, contudo no ensaio com o Trp 9' identificou-se por ESI-MS o ião a m/z de 436, compatível com o possível aducto $[M + K]^+$, e no ensaio 9'' atribuiu-se o ião a m/z 398 que pode corresponder ao aducto protonado.

III.10 Preparação de conjugados de CA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenina

Método geral – Dissolveu-se a CA (1 eq.) e a dG (9.8 eq.) em 2 mL de CH₃COOH: H₂O (1:1), e adicionou-se gota a gota durante 10 min uma solução de NaIO₄ (0,5 eq.) em 0,4 mL de CH₃COOH: H₂O (1:1). A reacção é mantida à t.a. durante 3 h. No final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico 88 %.²⁰ A reacção foi purificada de acordo com o procedimento descrito no método geral A em III.7.1, e os compostos analisados por ¹H-RMN e/ou ESI-MS.

Na Tabela III.4, estão apresentadas as condições experimentais realizadas para as reacções das CA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina, 2'-desoxiadenina.

Tabela III.4 - Condições experimentais nas reacções das CA com os bionucleófilos 2'-desoxiguanosina, e 2'-desoxiadenina.

Ensaio	CA (mg/μmol)	Método geral	Ox. (eq.)	Nuc. (eq.)
A	DA (10/53)	A em III.8.2	NaIO ₄ (0,5)	dG (10) ^a
B	DA (10/53)	III.10	NaIO ₄ (2,2)	dG (10)
C	DA (10/53)	III.10	NaIO ₄ (0,5)	dG (10)
D	DA (10/53)	III.8.1*	Ty	dG (5)
E	NADA (10/51)	A em III.8.2	Sal de Frémy (1,0)	dG (5) ^a
F	NADA (10/51)	A em III.8.2	Sal de Frémy (1,0)	dG (5) ^b
G	NADA (10/51)	III.8.1	Ty	dG (10) ^{a,c}
H	NADA (10/51)	III.8.1	Ty	dG (5) ^a
I	NADA (10/51) ²⁰	III.8.1	Ty	dG (5) ^d
J	NADA (10/51)	III.8.1*	Ty	dG (5) ^e
L	NADA (10/51) ^f	A em III.8.2	NaIO ₄ (0,5)	dG (5) ^d
M	NADA (10/51)	A em III.8.2	Sal de Frémy (1,0)	dA (5)

^a Dissolveu-se em DMF (4 mL) com aquecimento e tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (2 mL), ^b Dissolveu-se em 2 mL de DMF:CH₃COOH (1:1, pH 4), ^c Dissolveu-se em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (10 mL), e H₂O (5 mL), ^d Dissolveu-se em 3 mL de DMF:CH₃COOH: H₂O (1:1:1), ^e Dissolveu-se em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (5 mL), ^f Dissolveu-se em 1,5 mL de CH₃COOH: H₂O (1:1), ^g Dissolveu-se DA e dG em 2,6 mL de CH₃COOH: H₂O (1:1) e de seguida adicionou-se NaIO₄ dissolvido em 0,4 mL de CH₃COOH: H₂O (1:1),* não se removeu a enzima.

III.11 Estudos de RMN

III.11.1 Oxidação enzimática da CA

A uma solução de DA (2 mg) em tampão fosfato deuterado (pH 7,4; 50 mM), (500 μ L) adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,1 mg; 537 U). A evolução da reacção foi monitorizada por ^1H -RMN.

O mesmo procedimento foi aplicado ao composto NADA.

Realizou-se um ensaio com DA, onde adicionou-se à solução de *o*-quinona GSH (5 eq.) e continuou-se a monitorização. Os produtos correspondentes foram isolados por HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-FCT-1.

III.11.2 Oxidação química da CA

A uma solução de NADA (0,056 mM) em D_2O , adicionou-se NaIO_4 (1 eq.). A evolução da reacção foi monitorizada por ^1H -RMN. O mesmo procedimento foi aplicado aos compostos DA e DA-Cbz, mas com 1 e 2 eq. de NaIO_4 .

Numas das experiências da oxidação de NADA adicionou-se NACHis (10 eq.) à solução e continuou-se a monitorização.

III.12 Estudos espectrofotométricos

III.12.1 Oxidação enzimática da CA

Método geral A - Preparou-se uma solução de DA (2 mg) em tampão fosfato (pH 7,4; 50 mM), (5 mL) e mediu-se a absorvância. Adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,1 mg; 537 U) e seguiu-se a evolução da reacção no espectrofotômetro.

Método geral B – Numa célula de quartzo, apropriada para estudos espectrométricos, colocou-se uma solução de NADA de concentração de 0,47 μM e *tyrosinase* 62,3 U e adicionou-se tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) até perfazer um volume total de 2 mL. Monitorizou-se espectrofotometricamente o desenvolvimento da reacção, pela aquisição de espectros com intervalos de tempo de 1 min, durante 1 h. O mesmo procedimento foi realizado para a concentração de NADA de 1,39 μM com 187 U de *tyrosinase*.

III.13 Hidrólise de conjugados da *N*-acetildopamina e *N*, α -dimetildopamina

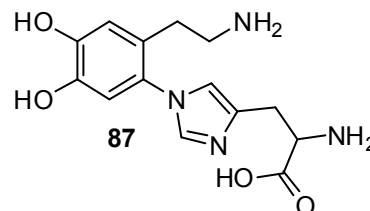
Método geral A – Dissolveu-se a *N*-acetil-CA (28 μ mol) em 10 mL de HCl (1,0 M), e aqueceu-se a 90 °C durante 6 h. Removeu-se o solvente sob vácuo e isolou-se os produtos no HPLC semi-preparativo, utilizando o programa HPLC-FCT-1.

Método B – Preparou-se uma solução de tri-Ac-diMeDA (14,5 mg, 47 μ mol) em 10 mL de HCl 1M em MeOH. A reacção foi mantida à t.a. durante 5 h. Evaporou à secura e adicionou-se água (2 \times 1,5 mL), e evaporou-se novamente à secura, repetiu-se o procedimento.

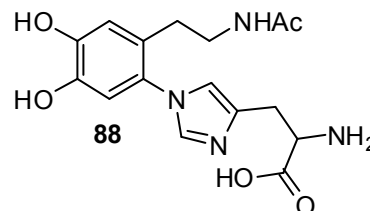
III.13.1.1 Hidrólise de 6-[(*N*-Acetil)histidin-*N*1'-il]-*N*-acetildopamina (25)

A hidrólise do composto 6-NAcHis-NADA (25) foi efectuada segundo o método geral A apresentado em III.13. Foram isolados os compostos:

(6-Histidin-*N*1'-il)-dopamina (87, 6-His-DA): recolhido sob a forma de um óleo amarelo (2,3 mg, 27 %). **UV/vis, λ :** 214 e 284 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 2,61 (2H, t, J = 7,7 Hz, H7), 2,98 (2H, t, J = 7,7 Hz, H8), 3,26 (2H, dd, J = 15,5 e 7,4 Hz, His-H β a), 3,35 (2H, dd, J = 15,4 e 5,8 Hz, His-H β b), 4,04 (1H, t, J = 7,7 Hz, His-H α), 6,89 (2H, s, H2/5), 6,90 (2H, s, H2/5), 7,48 (1H, s, His-H5), 8,82 (1H, s, His-H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O) δ :** 26,1 (His-C β), 27,6 (C7), 39,9 (C8), 53,7 (His-C α), 115,1 (C5), 117,4 (C2), 122,9 (His-C5), 125,0 (C6), 126,3 (C1), 128,9 (His-C4), 136,4 (His-C2), 144,2 (C3/4), 147,1 (C3/4), 163,2 (His-CO) ppm. **MS (ESI) m/z :** 307 [MH] $^+$. **HRMS-ESI m/z** calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4$ [MH] $^+$: 307,1401 obtido 307,1401.



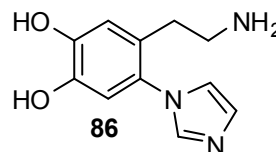
(6-Histidin-*N*1'-il)-*N*-acetildopamina (88, 6-His-NADA): O aducto foi isolado como um óleo amarelo (2,0 mg, 21 %). **UV/vis, λ :** 211 e 284 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :** 1,78 (3H, s, COCH $_3$), 2,46 (2H, t, J = 6,7 Hz, H7), 3,09 (2H, t, J = 6,6 Hz, H8), 3,34 (2H, d, J = 6,5 Hz, His-H β), 4,10 (1H, t, J = 6,6 Hz, His-H α), 6,84 (2H, s, H2/5), 6,85 (2H, s, H2/5), 7,48 (1H, s, His-H5), 8,81 (1H, s, His-H2) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O) δ :** 22,1 (COCH $_3$), 26,0 (His-C β), 29,7 (C7), 40,1 (C8), 55,4 (His-C α), 114,8 (C5), 117,6 (C2), 123,1 (His-C5), 126,4 (C6), 127,5 (C1), 128,5 (His-C4), 136,5 (His-



C2), 143,6 (C3/4), 146,7 (C3/4), 163,2 (His-CO), 174,3 (COCH₃) ppm. **MS (ESI)** m/z : 349 [MH]⁺. **HRMS-ESI** m/z calculado para C₁₆H₂₁N₄O₅ [MH]⁺: 349,1512 obtido 349,1506.

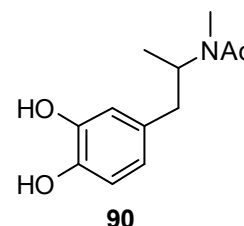
III.13.1.2 Hidrólise de (6-Imidazol-*N*1'-il)-*N*-acetildopamina (29)

A hidrólise do composto 6-Imid-NADA (4, 6 mg, 19 μmol) foi realizada segundo o método geral A descrito em III.13. Isolou-se o aducto **(6-*N*-Imidazol-*N*1'-il)-dopamina (86, 6-Imid-DA)** como um óleo amarelado, com um rendimento de 40 % (4,7 mg). **UV/vis**, λ: 284 nm. **¹H-RMN (D₂O)** δ: 2,64 (2H, t, J = 8,0 Hz, H7), 2,98 (3H, t, J = 7,9 Hz, H8), 6,90 (1H, s, H2/5), 6,91 (1H, s, H2/5), 7,56 (2H, s, Imid-H5/4), 8,86 (1H, s, Imid-H2) ppm. **MS (ESI)** m/z : 220 [MH]⁺. **HRMS-ESI** m/z calculado para C₁₁H₁₄N₃O₂ [MH]⁺: 220,1081 obtido 220,1081.



III.13.1.3 Hidrólise de *N*-acetil-di-*O*-acetil-*N*,α-dimetildopamina (105)

A reacção foi efectuada de acordo com o método geral B referido em III.13. O composto ***N*-acetil-*N*,α-dimetildopamina (90)**, foi obtido sob a forma de um óleo incolor (Rendimento quantitativo). **¹H-RMN (D₂O)** δ: 0,99 (3H, d, J = 6,4 Hz, H9), 1,13 (3H, d, J = 6,4 Hz, H9'), 1,52 (3H, s, COCH₃), 1,81 (3H, s, COCH₃'), 2,51-2,57 (4H, m, H7 + H7'), 2,67 (3H, s, N-CH₃), 2,72 (3H, s, N-CH₃'), 3,99-4,00 (1H, m, H8), 4,58-4,62 (1H, m, H8'), 6,47-6,51 (2H, m, H5/6), 6,59 (1H, s, H2), 6,60 (1H, s, H2'), 6,66-6,69 (2H, m, H5'/6') ppm. **¹³C-RMN (D₂O)** δ: 16,4 (C9), 17,7 (C9'), 19,7 (N-COCH₃), 20,7 (N-COCH₃'), 26,8 (N-CH₃), 29,7 (N-CH₃'), 37,9 (C7), 38,4 (C7'), 50,9 (C8'), 56,5 (C8), 115,9 (C5/6), 116,1 (C5'/6'), 116,5 (C2), 116,7 (C2'), 121,1 (C5/6), 121,3 (C5'/6'), 116,1 (C1), 116,1 (C1'), 142,2 (C3/4), 142,5 (C3/4'), 143,6 (C3/4), 143,7 (C3/4'), 173,9 (CO), 174,0 (CO') ppm. **MS (ESI)** m/z : 246 [MH + Na]⁺, 224 [MH]⁺. **HRMS-ESI** m/z calculado para C₁₂H₁₇NO₃ [MH]⁺: 224,1218 obtido 224,1316.



III.14 Reacções da dopamina e *N*-acetildopamina com o DNA

Técnica geral – A uma solução de CA (102 μ mol) em tampão fosfato (pH 7,4; 50 mM), (2 mL) adicionou-se NaIO_4 (1 eq.) ou *mushroom tyrosinase* (0,3 mg; 1200 U) e uma solução de *salmon testis DNA* (15 mg) em tampão fosfato (pH 7,4; 50 mM) (10 mL). A mistura foi incubada durante a noite a 37 °C.

O volume da amostra foi dividido em metade e para remover o material de partida que não reagiu, realizou-se uma extracção com AcOEt (2 \times 6 mL). Precipitou-se o DNA adicionando 0,6 mL de uma solução de 5 M de NaCl e 6,6 mL de etanol frio, centrifugou-se e recolheu-se o DNA, adicionou-se etanol 70 % frio e recolheu-se o DNA segundo o mesmo procedimento.

O DNA foi redissolvido em tampão Bis-Tris (5 mM) e 0,1 mM EDTA (pH 7,1), (5 mL) e sujeito a hidrólise térmica e enzimática. Na hidrólise térmica a amostra foi incubada durante 1 h a 95 °C. Precipitou-se o DNA como descrito acima e recolheu-se o sobrenadante, tendo-se concentrado a solução. Na hidrólise enzimática adicionou-se à amostra 50 μ L de uma solução de MgCl_2 1M, 0,5 mg de DNase e 0,5 mL de tampão DNase, tendo-se incubado durante 3 h a 37 °C. Adicionou-se à solução anterior 50 μ L de tampão Tris-HCl, 1 M, pH~8, 50 μ L de fosfodiesterase I e 20 μ L de fosfatase alcalina, a hidrólise permaneceu durante a noite a 37 °C. No final extraiu-se com uma solução saturada de BuOH, e evaporou-se à secura. As amostras recolhidas tanto na hidrólise térmica como enzimática foram purificadas no HPLC semi-preparativo usando o programa HPLC-IST-3.¹³⁷ Na Tabela III.5, estão apresentados os ensaios realizados.

Tabela III.5 - Reacções da DA e NADA com o DNA.

Ensaio	CA (mg/ μ mol)	Ox.	Aductos
A	NADA (20/102)	ty	- ^{a)}
B	NADA (18/92)	ty*	- ^{a)}
C	NADA (20/102)	NaIO_4	- ^{b)}
D	DA (20/105)	ty	- ^{a)}

* Remoção da enzima segundo o procedimento descrito em III.8.1.

-^{a)} não foi identificado nenhum aducto, -^{b)} identificado por ESI com m/z de 345 compatível com o aducto protonado da NADA com a Gua, após hidrólise térmica.

III.15 Reacções de CA com o péptido LQQCPF

III.15.1 Caracterização do péptido LQQCPF

Leucinil-glutaminil-glutaminil-

cisteínil-prolinil-fenilalanina (LQQCPF) t_R

= 13,2 min **UV/vis**, λ : 258 nm. **$^1\text{H-RMN}$**

(D_2O) δ : 0,84-0,86 (6H, m, Leu- CH_3/Bu),

1,53-1,99 (10H, m, $2\times$ Gln- $\text{H}\beta$ + Leu- $\text{H}\gamma$ +

Leu- $\text{H}\beta$ + Pro- $\text{H}\beta\alpha$ + Pro- $\text{H}\gamma\alpha$), 2,08-2,12

(1H, m, Pro- $\text{H}\beta/\gamma\beta$), 2,24-2,27 (4H, m, $2\times$

Gln- $\text{H}\gamma$), 2,74-2,76 (2H, m, Cys- $\text{H}\beta$), 3,01

(1H, dd, $J = 14,0$ Hz e $J = 8,4$ Hz, Phe- $\text{H}\beta\alpha$), 3,11 (1H, dd, $J = 14,0$ Hz e $J = 5,8$ Hz, Phe-

$\text{H}\beta\beta$), 3,63-3,67 (2H, m, Pro- $\text{H}\delta$), 3,93 (1H, t, $J = 7,1$ Hz, Leu- $\text{H}\alpha$), 4,23 (1H, t, $J = 7,2$ Hz,

Cys- $\text{H}\alpha$), 4,27-4,32 (2H, m, Pro- $\text{H}\alpha$ + Phe- $\text{H}\alpha$), ca. 4,70 (Gln- $\text{H}\alpha$), 7,18-7,30 (5H, m, Phe-

HAr) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$** (D_2O) δ : 21,1 (Leu- CH_3/Bu), 21,6 (Leu- CH_3/Bu), 23,8 (Pro- $\text{C}\beta/\gamma$), 24,3

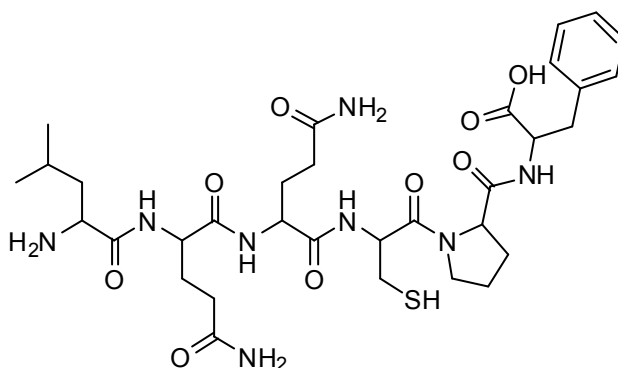
(Leu- $\text{C}\gamma$), 24,7 (Cys- $\text{C}\beta$), 26,8 ($2\times$ Gln- $\text{C}\beta$), 29,2 (Pro- $\text{C}\beta/\gamma$), 30,9 (Gln- $\text{C}\gamma$), 31,0 (Gln- $\text{C}\gamma$), 36,5

(Phe- $\text{C}\beta$), 39,8 (Leu- $\text{C}\beta$), 48,1 (Pro- $\text{C}\delta$), 51,7 (Leu- $\text{C}\alpha$), 52,9 (Phe- $\text{C}\alpha$), 53,0 (Cys- $\text{C}\alpha$), 53,7

(Gln- $\text{C}\alpha$), 53,9 (Gln- $\text{C}\alpha$), 60,6 (Pro- $\text{C}\alpha$), 127,2 (Phe- CAr_4), 128,7 (Phe- $\text{C}\text{Ar}_{2,6/3,5}$), 129,3

(Phe- $\text{C}\text{Ar}_{2,6/3,5}$), 136,5 (Phe- CAr_1), 166,4 (CO), 170,2 (Gln-CO), 170,4 (Gln-CO), 172,5

(CO), 173,5 (CO), 174,8 (CO), 177,7 ($2\times$ amidaCO). **MS (ESI)** m/z : 757 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 735 $[\text{MH}]^+$.



III.15.2 Por oxidação enzimática de CA

Técnica geral - Dissolveu-se 1 mg de CA em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (15 mL) e adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,1 mg, 40 U), tendo-se observado imediatamente uma mudança de cor para vermelho (DA, MeDA e diMeDA) ou amarelo (NADA) indicando a formação da correspondente *o*-quinona. Adicionou-se gota a gota uma solução de 2 eq. de LQQCPF em 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM). A reacção permaneceu sob agitação à t.a. durante 3 h. No final adicionou-se 1 mL de ácido fórmico, evaporou-se à secura e purificou-se por HPLC semi-preparativo utilizando o programa HPLC-IST-1.

III.15.2.1 Reacção com *N*-acetildopamina

A reacção foi efectuada de acordo com a técnica geral descrita em III.15.2 partindo de NADA, sendo isolado o composto:

5-S-(Leucinil-glutaminil-glutaminil-cisteínil-prolinil-fenilalanil)-*N*-acetildopamina

(**95**, **5-S-LQQCPF-NADA**) $t_R = 13,3$ min.

UV/vis, λ : 255 e 294 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ :

0,81-0,82 (6H, m, Leu-CH₃/Bu), 1,56-1,97

[14H, m, 2 \times Gln-H β + COCH₃ (1,80) + Leu-

H γ + 2 \times Pro-H β/γ + Leu-H β], 2,22-2,26

(4H, m, 2 \times Gln-H γ), 2,55 (2H, t, $J = 6,8$ Hz,

H7), 2,83-3,23 (8H, m, Phe-H β + Cys-H β +

H8 + Pro-H δ), 3,92-3,94 (1H, m, Leu-H α),

4,23-4,46 (5H, m, Cys-H α + Pro-H α + Phe-

H α + 2 \times Gln-H α), 6,71 (1H, s, H6), 6,76 (1H, s, H2), 7,12-7,23 (5H, m, Phe-HAr) ppm. **$^{13}\text{C-RMN}$ (D_2O)** δ :

21,0 (Leu-CH₃/Bu), 21,1 (Leu-CH₃/Bu), 21,6 (COCH₃), 23,8 (Pro-C β/γ), 24,2

(Leu-C γ), 26,9 (2 \times Gln-C β), 29,1 (Pro-C β/γ), 30,9 (Gln-C γ), 34,0 (C7), 34,4 (Pro-C δ /Phe-C β),

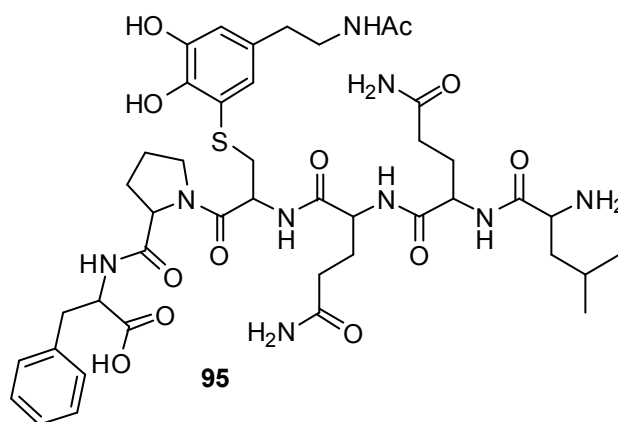
36,8 (Cys-C β), 39,8 (Leu-C β), 40,7 (C8), 47,2 (Pro-C δ /Phe-C β), 51,7 (Leu-C α), 53,0 (Cys-C α

+ Phe-C α), 54,9 (Gln-C α), 60,6 (Pro-C α), 117,2 (C6), 126,0 (C2), 126,9 (Phe-CAr4), 128,6

(Phe-CAr2,6/3,5), 129,3 (Phe-CAr2,6/3,5), 136,8 (Phe-CAr1), 167,8 (CO), 170,3 (Gln-CO),

172,3 (Gln-CO), 172,9 (CO), 173,1 (CO), 175,8 (CO), 177,5 (3 \times amidaCO) ppm. **MS (ESI)**

m/z : 950 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 928 $[\text{MH}]^+$.



III.15.2.2 Reacção com dopamina

A reacção foi efectuada de acordo com a técnica geral descrita em III.15.2 partindo da DA, e foram isolados os aductos:

2-S-(Leucinil-glutaminil-glutaminil-

cisteínil-prolinil-fenilalanil)-dopamina (**96**,

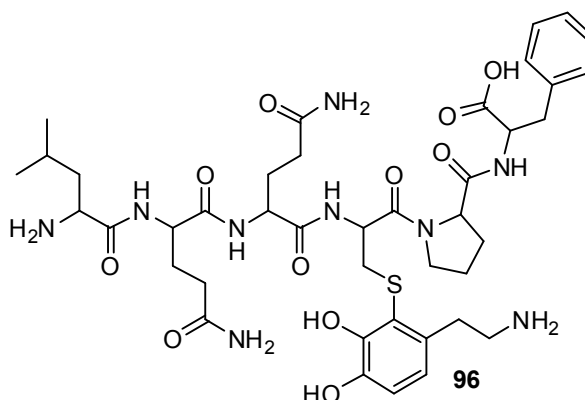
2-S-LQQCPF-DA) $t_R = 9,8$ min. **UV/vis**, λ : 257

e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 0,81 (6H, m, Leu-

CH₃/Bu), 1,56-2,28 (15H, m, 2 \times Gln-H β + 2 \times

Gln-H γ + Leu-H γ + 2 \times Pro-H β/γ + Leu-H β),

2,89-3,24 (10H, m, Phe-H β + Cys-H β + Pro-



H δ + H7 + H8), 3,93 (1H, t, J = 7,0 Hz, Leu-H α), 4,21-4,31 (5H, m, Cys-H α + Pro-H α + Phe-H α + 2 \times Gln-H α), 6,73 (1H, d, J = 8,2 Hz, H6), 6,86 (1H, d, J = 7,9 Hz, H5), 7,13-7,23 (5H, m, Phe-HAr) ppm. **MS (ESI)** m/z : 909 [M + Na] $^+$, 887 [MH] $^+$.

5 -S-(Leucinil-glutaminil-glutaminil-cisteínil-prolinil-fenilalanil)-dopamina (97, 5-S-LQQCPF-DA) t_R = 10,3 min. **UV/vis**, λ :

256 e 293 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ : 0,84-

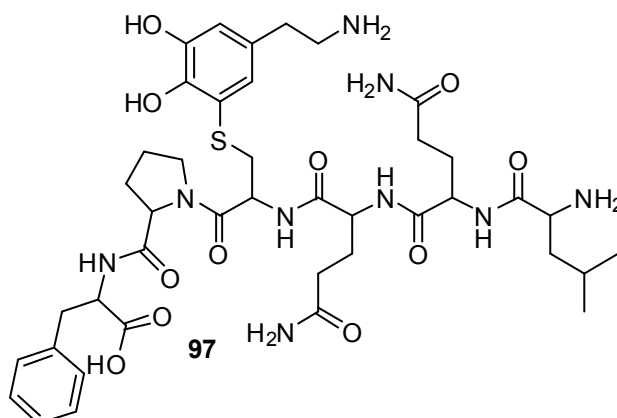
0,87 (6H, m, Leu-CH $_3$ /Bu), 1,59-2,79

(15H, m, 2 \times Gln-H β + 2 \times Gln-H γ + Leu-H γ + 2 \times Pro-H β/γ + Leu-H β), 2,74-3,25

(10H, m, Phe-H β + Cys-H β + Pro-H δ + H7 + H8), 3,93-3,95 (1H, m, Leu-H α),

4,25-4,41 (5H, m, Cys-H α + Pro-H α + Phe-H α + 2 \times Gln-H α), 6,77 (1H, s, H6),

6,87 (1H, s, H2), 7,12-7,24 (5H, m, Phe-HAr) ppm. **MS (ESI)** m/z : 925 [M + K] $^+$, 909 [M + Na] $^+$, 887 [MH] $^+$.



III.15.2.3 Reacção com a α -metildopamina

Realizou-se a reacção de acordo com a técnica geral descrita em III.15.2 partindo de MeDA. Foi isolado o aducto:

5-S-(Leucinil-glutaminil-glutaminil-cisteínil-prolinil-fenilalanil)- α -metildopamina (98, 5-S-LQQCPF-MeDA) t_R = 10,5 min.

UV/vis, λ : 256 e 294 nm. **$^1\text{H-RMN}$ (D_2O)** δ :

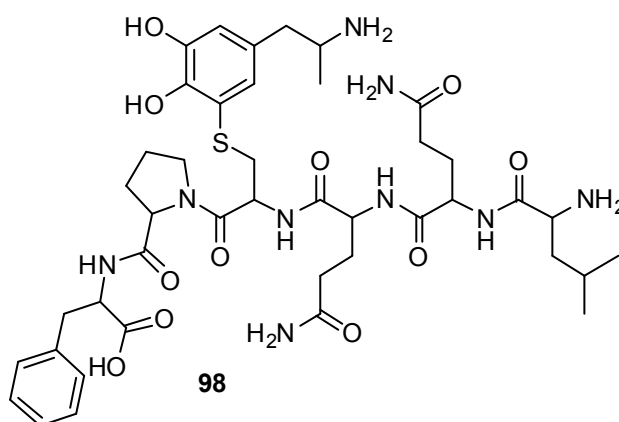
0,81-0,83 (6H, m, Leu-CH $_3$ /Bu), 1,15-1,17

(3H, m, H9), 1,31-2,60 (15H, m, 2 \times Gln-H β + 2 \times Gln-H γ + Leu-H γ + 2 \times Pro-H β/γ + Leu-H β), 2,66-3,45 (9H, m, Phe-H β + Cys-

H β + Pro-H δ + H7 + H8), 3,93 (1H, t, J = 7,0 Hz, Leu-H α), 4,23-4,42 (5H, m, Cys-H α

+ Pro-H α + Phe-H α + 2 \times Gln-H α), 6,73

(1H, s, H6), 6,83 (1H, s, H2), 7,15-7,24 (5H, m, Phe-HAr) ppm. **MS (ESI)** m/z : 901 [MH] $^+$.



III.15.2.4 Reacção com a *N*, α -dimetildopamina

A reacção foi executada pela técnica geral descrita em III.15.2 partindo de diMeDA. Foi recolhido o composto:

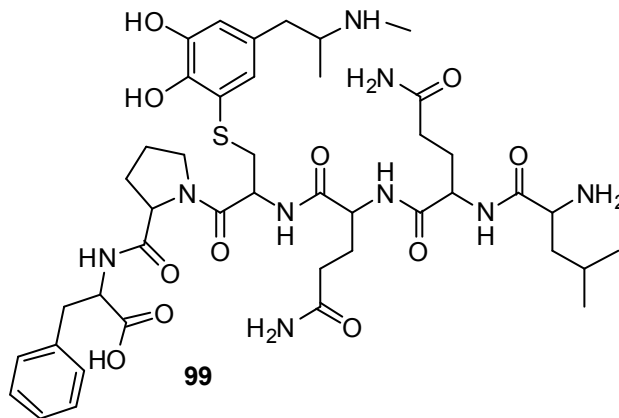
5-S-(Leucinil-glutaminil-glutaminil-cisteinil-prolinil-fenilalanil)-*N*, α -dimetildopamina

(**99**, 5-S-LQQCPF-diMeDA) $t_R = 10,6$ min.

UV/vis, λ : 256 e 294 nm. $^1\text{H-RMN}$ (D_2O) δ :

0,91-1,02 (6H, m, Leu- CH_3/Bu), 1,23-1,27 (3H, m, H β), 1,55-2,24 (15H, m, 2 \times Gln-H β + 2 \times Gln-H γ + Leu-H γ + 2 \times Pro-H β/γ + Leu-H β), 2,74 (3H, s, N- CH_3), 2,99-3,47 (9H, m, Phe-H β + Cys-H β + Pro-H δ + H7 + H8), 4,04 (1H, t, $J = 7,0$ Hz, Leu-H α), 4,25-4,41 (5H, m, Cys-H α + Pro-H α + Phe-H α + 2 \times Gln-H α), 6,84 (1H, s, H6), 6,89 (1H, s, H2), 7,12-7,37 (5H, m, Phe-HAr) ppm. **MS (ESI)**

m/z : 915 $[\text{MH}]^+$.



III.16 Reacções de modificação de proteínas com CA

III.16.1 Reacções de modificação da HSA

III.16.1.1 Por oxidação enzimática de CA

Método geral - Preparou-se uma solução de CA (30 μmol) em tampão Tris (pH 7,4, 50 mM) (2 mL) e adicionou-se *mushroom tyrosinase* (0,2 mg, 1000 U). Colocou-se a mistura reaccional numa coluna *HitrapTM desalting* (GE Healthcare®) e eluiu-se com água, de modo a remover a enzima. À solução de o-quinona recolhida foi adicionado gota a gota uma solução de HSA (10 mg) em tampão Tris (pH 7,4, 50 mM) (10 mL). A mistura reaccional foi incubada com agitação durante a noite a 37 °C. Extraíu-se com acetato de etilo (2 \times 5 mL), e a fase aquosa foi transferida para filtros de crivagem (PES 5K, 500 μL), centrifugou-se durante 3 min, a 8000g. Recolheu-se o sobrenadante e concentrou-se sob vácuo. Na Tabela III.6 são apresentadas as condições experimentais utilizadas nos vários ensaios realizados com a HSA.

Tabela III.6 - Ensaios de modificação da HSA por diferentes CA.

CA	razão CA/HSA
NADA	1:2
NADA*	1:4
NADA*	1:10
NADA*	1:20
MeDA	1:20
diMeDA	1:20
DA	1:20

*As concentrações de NADA-quinona apresentadas foram preparadas por diluição da solução de o-quinona recolhida após remoção da enzima.

III.16.1.2 Por oxidação química de CA

Método geral – Dissolveu-se NADA (5,3 mg, 27,1 μ mol) em 2 mL de tampão Tris (pH 7,4, 50 mM). Adicionou-se NaIO_4 (1 eq.) e uma solução de HSA (12,5 mL, 1 mg/mL) em Tris (pH 7,4, 50 mM), e incubou-se com agitação durante a noite a 37 °C. Na Tabela III.7 encontram-se as proporções NADA/HSA utilizadas nos vários ensaios. Nos ensaios 1 e 2, o restante tratamento das amostras foi realizado como descrito no método geral em III.16.1.1. No ensaio 3 e 4, após extracção com AcOEt a solução foi dialisada contra 2 L de água desionizada durante 24 h (ensaio 3) e 48 h (ensaio 4).

Tabela III.7 - Ensaios de modificação da HSA com NADA gerada com NaIO_4 .

Ensaio	razão NADA/HSA	Tratamento da amostra
1	1:2	filtros de crivagem
2	1:20	filtros de crivagem
3	1:2	24 h de diálise
4	1:2	48 h de diálise

III.16.2 Reacções de modificação de Hb e hhMb com NADA

III.16.2.1 Por oxidação enzimática da NADA

Técnica geral – Preparou-se uma solução de NADA-quinona dissolvendo 5,5 mg de NADA (28,2 μ mol) em 2 mL de tampão Tris (pH 7,4, 50 mM) e adicionando *mushroom tyrosinase* (0,2 mg, 1000 U). A enzima foi removida com descrito em III.16.1.1. À solução de quinona foi adicionado 10 mg de Hb em tampão Tris (pH 7,4, 50 mM) (10 mL), a mistura reaccional foi incubada durante a noite sob agitação a 37 °C. Extraíu-se com AcOEt (2 \times 5 mL) e precipitou-se à apoproteína,⁶⁴ adicionando 2 mL de uma solução de acetona contendo 0,3% de HCl 2N seguido de 5 mL de acetona fria. A apoproteína foi recolhida após centrifugação durante 1 min, a 8000g e secagem no *Speed Vac*. As condições experimentais utilizadas nos vários ensaios realizados encontram-se na Tabela III.8.

Tabela III.8 - Condições experimentais nos ensaios de modificação de Hb e hhMb com NADA.

Proteína	razão NADA/Proteína	Tampão (pH 7,4, 50 mM)
Hb	1:2	Tris
Hb*	1:4	Tris
Hb*	1:10	Tris
Hb*	1:20	Tris
hhMb	1:2	fosfato

*NADA-quinona preparada por diluição da solução de *o*-quinona recolhida após remoção da enzima.

III.16.2.2 Por oxidação química da NADA

Técnica geral - A uma solução de NADA (6 mg, 30 μ mol) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM) (5 mL) adicionou-se NaIO₄ (6,6 mg, 30 μ mol) e 10 mL de uma solução de Hb ou hhMb (1 mg/mL) em tampão fosfato (pH 7,4, 50 mM). O restante procedimento experimental foi idêntico ao descrito na técnica A em III.16.2.1..

III.17 Condições de hidrólise das proteínas e do péptido LQQCPF

III.17.1 Digestão aos péptidos das proteínas modificadas

III.17.1.1 Condições de hidrólise

Digestão enzimática clássica - Preparou-se uma solução de proteína-modificada de 1 mg/mL em água MilliQ:MeCN (1:1), e colocou-se 1 min no SONOREACTOR 50%. Retirou-se 20 μ L de solução e adicionou-se 2 μ L de uma solução de DTT (100 mM em Ambic 12,5 mM), incubou-se 1 h a 37 °C. Adicionou-se 2 μ L de uma solução de IAA (600 mM em Ambic 12,5 mM) e incubou-se ao abrigo da luz durante 45 min à t.a.. A solução foi diluída para 96 μ L com Ambic 12,5 mM. Retirou-se 10 μ L e juntou-se 2 μ L de uma solução de tripsina 0,05 μ g/ μ L em TFA 0,01% e incubou-se durante a noite a 37 °C, de modo a realizar a digestão da proteína. A razão tripsina/proteína utilizada é sempre de 1:20, assim sendo 2 μ g de proteína são digeridas com 0,1 μ g de tripsina. No final adicionou-se 1 μ L de ácido fórmico 50% (v/v) para parar a actividade da enzima.

Método geral B - As digestões foram realizadas numa proporção de tripsina/proteína de 1:200, em 1 mL de tampão Tris (pH 8, 100 mM) contendo 2 mM CaCl_2 . As amostras foram incubadas durante a noite a 37 °C, e de seguida concentradas no *Speed Vac* e analisadas por MALDI-TOF-MS.^{31, 64, 89}

Control com proteínas - As HSA, apoHb, apohhMb foram sujeitas ao protocolo de digestão enzimática clássica. As apoproteínas (apoHb, apohhMb) foram ainda hidrolisadas segundo o método geral B.

III.17.2 Digestão aos aminoácidos das proteínas e do péptido modificados

III.17.2.1 Condições gerais

A uma solução de 1 mg de proteína modificada dissolvida em PBS (350 μ L) adicionou-se pronase E (19 μ L, 530 μ g/mL) e LAP (8 μ L, 130 μ g/mL). Incubou-se a solução durante a noite e sob agitação a 37 °C. A solução foi seca e posteriormente analisada por LC-ESI-MS/MS.⁷²

III.17.2.2 Ensaio com temperatura a 50°C

A uma solução de 1 mg de proteína modificada dissolvida em PBS (350 μL) adicionou-se pronase E (19 μL , 530 $\mu\text{g/mL}$) durante 4 h a 50 °C, e uma nova carga de enzima juntamente com LAP (8 μL , 130 $\mu\text{g/mL}$) por mais 24 h, a 50 °C. As amostras foram secas no *Speed Vac*, e posteriormente analisada por LC-ESI-MS/MS.⁷⁷

Capítulo IV – Bibliografia

1. Sorouraddin, H. M.; Hibara, A.; Kitamori, T., "Use of a thermal lens microscope in integrated catecholamine determination on a microchip". *Fresen J Anal Chem* **2001**, 371, (2), 91-96.
2. Kaushik, P.; Gorin, F.; Vali, S., "Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis". *J Comput Neurosci* **2007**, 22, (2), 147-160.
3. Stokes, A. H.; Hastings, T. G.; Vrana, K. E., "Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine". *J Neurosci Res* **1999**, 55, (6), 659-665.
4. Borta, A.; Hoglinger, G. U., "Dopamine and adult neurogenesis". *J Neurochem* **2007**, 100, (3), 587-595.
5. Tansey, M. G.; McCoy, M. K.; Frank-Cannon, T. C., "Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention". *Exp Neurol* **2007**, 208, (1), 1-25.
6. Daubner, S. C.; Le, T.; Wang, S. Z., "Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis". *Arch Biochem Biophys* **2011**, 508, (1), 1-12.
7. Okereke, C. S., "Role of integrative pharmacokinetic and pharmacodynamic optimization strategy in the management of Parkinson's disease patients experiencing motor fluctuations with levodopa". *J Pharm Pharm Sci* **2002**, 5, (2), 146-161.
8. Antkiewicz-Michaluk, L.; Michaluk, J.; Mokrosz, M.; Romanska, I.; Lorenc-Koci, E.; Ohta, S.; Vetulani, J., "Different action on dopamine catabolic pathways of two endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with similar antidopaminergic properties". *J Neurochem* **2001**, 78, (1), 100-108.
9. Miller, J. W.; Selhub, J.; Joseph, J. A., "Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: Protective effects of O-methylation and melatonin". *Free Radical Bio Med* **1996**, 21, (2), 241-249.
10. Alves, G.; Forsaa, E. B.; Pedersen, K. F.; Gjerstad, M. D.; Larsen, J. P., "Epidemiology of Parkinson's disease". *J Neurol* **2008**, 255, 18-32.
11. Zhang, F.; Dryhurst, G., "Effects of L-Cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: New reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease". *J Med Chem* **1994**, 37, (8), 1084-1098.
12. Sayre, L. M.; Perry, G.; Smith, M. A., "Oxidative stress and neurotoxicity". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (1), 172-188.
13. <http://bio.org/splice/20070613.asp?p=yes> (02/09/2011).
14. Vauzour, D.; Ravaioli, G.; Vafeiadou, K.; Rodriguez-Mateos, A.; Angeloni, C.; Spencer, J. P. E., "Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHBT-1: Implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols". *Arch Biochem Biophys* **2008**, 476, (2), 145-151.
15. Andersen, J. K., "Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?". *Nat Med* **2004**, 10, (7), S18-S25.
16. Miyazaki, I.; Asanuma, M., " Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself". *Acta Med Okayama* **2008**, 62, (3), 141-50.

17. Zhang, J.; Kravtsov, V.; Amarnath, V.; Picklo, M. J.; Graham, D. G.; Montine, T. J., "Enhancement of dopaminergic neurotoxicity by the mercapturate of dopamine: Relevance to Parkinson's disease". *J Neurochem* **2000**, 74, (3), 970-978.
18. Vauzour, D.; Vafeiadou, K.; Spencer, J. P. E., "Inhibition of the formation of the neurotoxin 5-S-cysteinyl-dopamine by polyphenols". *Biochem Bioph Res Co* **2007**, 362, (2), 340-346.
19. Jameson, G. N. L.; Zhang, J.; Jameson, R. F.; Linert, W., "Kinetic evidence that cysteine reacts with dopaminoquinone *via* reversible adduct formation to yield 5-cysteinyl-dopamine: an important precursor of neuromelanin". *Org Biomol Chem* **2004**, 2, (5), 777-782.
20. Cavalieri, E. L.; Li, K. M.; Balu, N.; Saeed, M.; Devanesan, P.; Higginbotham, S.; Zhao, J.; Gross, M. L.; Rogan, E. G., "Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases". *Carcinogenesis* **2002**, 23, (6), 1071-1077.
21. Graham, D. G., "Oxidative pathways for catecholamines in genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones". *Mol Pharmacol* **1978**, 14, (4), 633-643.
22. Graham, D. G.; Klintworth, G. K., "Oxidative pathways for catecholamines in genesis of neuromelanin, cytotoxic quinones and superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and hydroxide (OH^{\cdot}) radicals". *J Neuropath Exp Neur* **1978**, 37, (5), 619-619.
23. Hastings, T. G.; Lewis, D. A.; Zigmond, M. J., "Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections". *P Natl Acad Sci USA* **1996**, 93, (5), 1956-1961.
24. Shen, X. M.; Dryhurst, G., "Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: Reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease". *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, (4), 751-763.
25. Shen, X. M.; Xia, B.; Wrona, M. Z.; Dryhurst, G., "Synthesis, redox properties, *in vivo* formation, and neurobehavioral effects of *N*-acetylcysteinyl conjugates of dopamine: Possible metabolites of relevance to Parkinson's disease". *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, (7), 1117-1126.
26. Zhang, F.; Dryhurst, G., "Reactions of cysteine and cysteinyl derivatives with dopamine-o-quinone and further insights into the oxidation chemistry of 5-S-cysteinyl-dopamine: Potential relevance to idiopathic Parkinson's disease". *Bioorg Chem* **1995**, 23, (3), 193-216.
27. Xu, R. D.; Huang, X.; Kramer, K. J.; Hawley, M. D., "Characterization of products from the reactions of dopamine quinone with *N*-acetylcysteine". *Bioorg Chem* **1996**, 24, (1), 110-126.
28. Zhang, F.; Dryhurst, G., "Influence of glutathione on the oxidation chemistry of the catecholaminergic neurotransmitter dopamine". *J Electroanal Chem* **1995**, 398, (1-2), 117-128.
29. Rosengren, E.; Lindereliasson, E.; Carlsson, A., "Detection of 5-S-cysteinyl-dopamine in human brain". *J Neural Transm* **1985**, 63, (3-4), 247-253.
30. Spencer, J. P. E.; Jenner, P.; Daniel, S. E.; Lees, A. J.; Marsden, D. C.; Halliwell, B., "Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: Possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species". *J Neurochem* **1998**, 71, (5), 2112-2122.

31. Nicolis, S.; Zucchelli, M.; Monzani, E.; Casella, L., "Myoglobin modification by enzyme-generated dopamine reactive species". *Chem Eur J* **2008**, 14, (28), 8661-8673.
32. Land, E. J.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A., "Tyrosinase autoactivation and the chemistry of *ortho*-quinone amines". *Accounts Chem Res* **2003**, 36, (5), 300-308.
33. Tse, D. C. S.; Mccreery, R. L.; Adams, R. N., "Potential oxidative pathways of brain catecholamines". *J Med Chem* **1976**, 19, (1), 37-40.
34. Agrup, G.; Hansson, C.; Rorsman, H.; Rosengren, E., "The effect of cysteine on oxidation of tyrosine, dopa, and cysteinyl dopas". *Arch Dermatol Res* **1982**, 272, (1-2), 103-115.
35. Huang, X.; Xu, R. D.; Hawley, M. D.; Hopkins, T. L.; Kramer, K. J., "Electrochemical oxidation of *N*-acetyldopamines and regioselective reactions of their quinones with *N*-acetylcysteine and thiourea". *Arch Biochem Biophys* **1998**, 352, (1), 19-30.
36. Shen, X. M.; Dryhurst, G., "Iron- and manganese-catalyzed autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: Possible insights into iron- and manganese-mediated dopaminergic neurotoxicity". *Chem Res Toxicol* **1998**, 11, (7), 824-837.
37. Huang, X.; Xu, R. D.; Hawley, M. D.; Kramer, K. J., "Model insect cuticle sclerotization: Reactions of catecholamine quinones with the nitrogen-centered nucleophiles imidazole and *N*-acetylhistidine". *Bioorg Chem* **1997**, 25, (3), 179-202.
38. Andersen, S. O., "Insect cuticular sclerotization: A review". *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **2010**, 40, (3), 166-178.
39. Xu, R. D.; Huang, X.; Morgan, T. D.; Prakash, O.; Kramer, K. J.; Hawley, M. D., "Characterization of products from the reactions of *N*-acetyldopamine quinone with *N*-acetylhistidine". *Arch Biochem Biophys* **1996**, 329, (1), 56-64.
40. Elchisak, M. A.; Hausner, E. A., "Demonstration of *N*-acetyldopamine in human kidney and urine". *Life Sci.* **1984**, 35, (25), 2561-2569.
41. Zahid, M.; Saeed, M.; Rogan, E. G.; Cavalieri, E. L., "Benzene and dopamine catechol quinones could initiate cancer or neurogenic disease". *Free Radical Bio Med* **2010**, 48, (2), 318-324.
42. Cavalieri, E. L.; Rogan, E. G.; Chakravarti, D., "Initiation of cancer and other diseases by catechol *ortho*-quinones: a unifying mechanism". *Cell Mol Life Sci* **2002**, 59, (4), 665-681.
43. Capela, J. P.; Meisel, A.; Abreu, A. R.; Branco, P. S.; Ferreira, L. M.; Lobo, A. M.; Remiao, F.; Bastos, M. L.; Carvalho, F., "Neurotoxicity of ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia". *J Pharmacol Exp Ther* **2006**, 316, (1), 53-61.
44. Macedo, C.; Branco, P. S.; Ferreira, L. M.; Lobo, A. M.; Capela, J. P.; Fernandes, E.; Bastos, M. D.; Carvalho, F., "Synthesis and cyclic voltammetry studies of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) human metabolites". *J Health Sci* **2007**, 53, (1), 31-42.
45. Milhazes, N.; Martins, P.; Uriarte, E.; Garrido, J.; Calheiros, R.; Marques, M. P. M.; Borges, F., "Electrochemical and spectroscopic characterisation of amphetamine-like drugs: Application to the screening of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its synthetic precursors". *Anal Chim Acta* **2007**, 596, (2), 231-241.

46. Shima, N.; Kamata, H.; Katagi, M.; Tsuchihashi, H.; Sakuma, T.; Nemoto, N., "Direct determination of glucuronide and sulfate of 4-hydroxy-3-methoxymethamphetamine, the main metabolite of MDMA, in human urine". *J Chromatogr B* **2007**, 857, (1), 123-129.
47. Carvalho, M.; Milhazes, N.; Remiao, F.; Borges, F.; Fernandes, E.; Amado, F.; Monks, T. J.; Carvalho, F.; Bastos, M. L., "Hepatotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and alpha-methyldopamine in isolated rat hepatocytes: formation of glutathione conjugates". *Arch Toxicol* **2004**, 78, (1), 16-24.
48. Shenouda, S. K.; Varner, K. J.; Carvalho, F.; Lucchesi, P. A., "Metabolites of MDMA induce oxidative stress and contractile dysfunction in adult rat left ventricular myocytes". *Cardiovasc Toxicol* **2009**, 9, (1), 30-38.
49. Erives, G. V.; Lau, S. S.; Monks, T. J., "Accumulation of neurotoxic thioether metabolites of 3,4-(+/-)-methylenedioxymethamphetamine in rat brain". *J Pharmacol Exp Ther* **2008**, 324, (1), 284-291.
50. Miller, R. T.; Lau, S. S.; Monks, T. J., "Metabolism of 5-(glutathione-S-yl)-alpha-methyldopamine following intracerebroventricular administration to male sprague-dawley rats". *Chem Res Toxicol* **1995**, 8, (5), 634-641.
51. Jones, D. C.; Duvauchelle, C.; Ikegami, A.; Olsen, C. M.; Lau, S. S.; de la Torre, R.; Monks, T. J., "Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain". *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 313, (1), 422-431.
52. de la Torre, R.; Farre, M.; Ortuno, J.; Mas, M.; Brenneisen, R.; Roset, P. N.; Segura, J.; Cami, J., "Non-linear pharmacokinetics of MDMA ('ecstasy') in humans". *Brit J Clin Pharmacol* **2000**, 49, (2), 104-109.
53. Hiramatsu, M.; Kumagai, Y.; Unger, S. E.; Cho, A. K., "Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: Formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct". *J Pharmacol Exp Ther* **1990**, 254, (2), 521-527.
54. Pizarro, N.; de la Torre, R.; Joglar, J.; Okumura, N.; Perfetti, X.; Lau, S. S.; Monks, T. J., "Serotonergic neurotoxic thioether metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy'): Synthesis, isolation, and characterization of diastereoisomers". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (12), 2272-2279.
55. Felim, A.; Urios, A.; Neudorffer, A.; Herrera, G.; Blanco, M.; Largeron, M., "Bacterial plate assays and electrochemical methods: An efficient tandem for evaluating the ability of catechol-thioether metabolites of MDMA ('ecstasy') to induce toxic effects through redox-cycling". *Chem Res Toxicol* **2007**, 20, (4), 685-693.
56. Liebler, D. C., "Protein damage by reactive electrophiles: Targets and consequences". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (1), 117-128.
57. Tornqvist, M.; Fred, C.; Haglund, J.; Helleberg, H.; Paulsson, B.; Rydberg, R., "Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications". *J Chromatogr B* **2002**, 778, (1-2), 279-308.
58. Baillie, T. A., "Future of toxicology-metabolic activation and drug design: Challenges and opportunities in chemical toxicology". *Chem Res Toxicol* **2006**, 19, (7), 889-893.
59. Dass, C., *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Wiley-Interscience: **2007**.

60. Rubino, F. M.; Pitton, M.; Di Fabio, D.; Colombi, A., "Toward an "omic" physiopathology of reactive chemicals: Thirty years of mass spectrometric study of the protein adducts with endogenous and xenobiotic compounds". *Mass Spectrom Rev* **2009**, 28, (5), 725-784.
61. Yang, X. X.; Hu, Z. P.; Chan, S. Y.; Zhou, S. F., "Monitoring drug-protein interaction". *Clin Chim Acta* **2006**, 365, (1-2), 9-29.
62. Swenberg, J. A.; Fryar-Tita, E.; Jeong, Y. C.; Boysen, G.; Starr, T.; Walker, V. E.; Albertini, R. J., "Biomarkers in toxicology and risk assessment: Informing critical dose-response relationships". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (1), 253-265.
63. Funk, W. E.; Li, H.; Iavarone, A. T.; Williams, E. R.; Riby, J.; Rappaport, S. M., "Enrichment of cysteinyl adducts of human serum albumin". *Anal Biochem* **2010**, 400, (1), 61-68.
64. Fenaille, F.; Tabet, J. C.; Guy, P. A., "Identification of 4-hydroxy-2-nonenal-modified peptides within unfractionated digests using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry". *Anal Chem* **2004**, 76, (4), 867-873.
65. Rappaport, S. M.; Waidyanatha, S.; Qu, Q. S.; Shore, R.; Jin, X. M.; Cohen, B.; Chen, L. C.; Melikian, A. A.; Li, G. L.; Yin, S. N.; Yan, H. F.; Xu, B. H.; Mu, R. D.; Li, Y. Y.; Zhang, X. L.; Li, K. Q., "Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolism". *Cancer Res* **2002**, 62, (5), 1330-1337.
66. Rappaport, S. M.; Yeowell-O'Connell, K.; Smith, M. T.; Dosemeci, M.; Hayes, R. B.; Zhang, L. P.; Li, G. L.; Yin, S. N.; Rothman, N., "Non-linear production of benzene oxide-albumin adducts with human exposure to benzene". *J Chromatogr B* **2002**, 778, (1-2), 367-374.
67. Boatman, R. J.; English, J. C.; Perry, L. G.; Fiorica, L. A., "Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: Identification and quantitation of sulfhydryl-bound forms". *Chem Res Toxicol* **2000**, 13, (9), 853-860.
68. Boatman, R. J.; English, J. C.; Perry, L. G.; Fiorica, L. A., "Covalent protein adducts of hydroquinone in tissues from rats: Quantitation of sulfhydryl-bound forms following single gavage or intraperitoneal administration or repetitive gavage administration". *Chem Res Toxicol* **2000**, 13, (9), 861-872.
69. Szapacs, M. E.; Riggins, J. N.; Zimmerman, L. J.; Liebler, D. C., "Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: Kinetic analysis of competing alkylation reactions". *Biochemistry-US* **2006**, 45, (35), 10521-10528.
70. Li, F.; Chordia, M. D.; Woodling, K. A.; Macdonald, T. L., "Irreversible alkylation of human serum albumin by zileuton metabolite 2-acetylbenzothiophene-S-oxide: A potential model for hepatotoxicity". *Chem Res Toxicol* **2007**, 20, (12), 1854-1861.
71. Varshney, A.; Sen, P.; Ahmad, E.; Rehan, M.; Subbarao, N.; Khan, R. H., "Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized?". *Chirality* **2010**, 22, (1), 77-87.
72. Antunes, A. M. M.; Godinho, A. L. A.; Martins, I. L.; Oliveira, M. C.; Gomes, R. A.; Coelho, A. V.; Beland, F. A.; Marques, M. M., "Protein adducts as prospective biomarkers of nevirapine toxicity". *Chem Res Toxicol* **2010**, 23, (11), 1714-1725.

73. Candiano, G.; Petretto, A.; Bruschi, M.; Santucci, L.; Dimuccio, V.; Prunotto, M.; Gusmano, R.; Urbani, A.; Ghiggeri, G. M., "The oxido-redox potential of albumin Methodological approach and relevance to human diseases". *J Proteomics* **2009**, 73, (2), 188-195.
74. Aldini, G.; Gamberoni, L.; Orioli, M.; Beretta, G.; Regazzoni, L.; Facino, R. M.; Carini, M., "Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxy-*trans*-2-nonenal". *J Mass Spectrom* **2006**, 41, (9), 1149-1161.
75. Aldini, G.; Vistoli, G.; Regazzoni, L.; Gamberoni, L.; Facino, R. M.; Yamaguchi, S.; Uchida, K.; Carini, M., "Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: A protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species?". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (4), 824-835.
76. Aldini, G.; Regazzoni, L.; Orioli, M.; Rimoldi, I.; Facino, R. M.; Carini, M., "A tandem MS precursor-ion scan approach to identify variable covalent modification of albumin Cys34: a new tool for studying vascular carbonylation". *J Mass Spectrom* **2008**, 43, (11), 1470-1481.
77. Waidyanatha, S.; Sangaiah, R.; Rappaport, S. M., "Characterization and quantification of cysteinyl adducts of benzene diol epoxide". *Chem Res Toxicol* **2005**, 18, (7), 1178-1185.
78. Waidyanatha, S.; Lin, P. H.; Rappaport, S. M., "Characterization of chlorinated adducts of hemoglobin and albumin following administration of pentachlorophenol to rats". *Chem Res Toxicol* **1996**, 9, (3), 647-653.
79. Busto, M. E. D.; Montes-Bayon, M.; Sanz-Medel, A., "The potential of mass spectrometry to study iron-containing proteins used in clinical diagnosis". *Anal Chim Acta* **2009**, 634, (1), 1-14.
80. Meunier, B.; Robert, A., "Heme as trigger and target for trioxane-containing antimalarial drugs". *Accounts Chem Res* **2010**, 43, (11), 1444-1451.
81. Diedrich, J. K.; Julian, R. R., "Site-selective fragmentation of peptides and proteins at quinone-modified cysteine residues investigated by ESI-MS". *Anal Chem* **2010**, 82, (10), 4006-4014.
82. Moll, T. S.; Harms, A. C.; Elfarra, A. A., "A comprehensive structural analysis of hemoglobin adducts formed after in vitro exposure of erythrocytes to butadiene monoxide". *Chem Res Toxicol* **2000**, 13, (11), 1103-1113.
83. Kristiansson, M. H.; Jonsson, B. A. G.; Lindh, C. H., "Mass spectrometric characterization of human hemoglobin adducts formed in vitro by hexahydrophthalic anhydride". *Chem Res Toxicol* **2002**, 15, (4), 562-569.
84. Barshteyn, N.; Elfarra, A. A., "Mass spectral analyses of hydroxymethylvinyl ketone-hemoglobin adducts formed after in vivo exposure of sprague-dawley rats to 3-butene-1,2-diol". *Chem Res Toxicol* **2009**, 22, (6), 1163-1171.
85. Hendgen-Cotta, U. B.; Kelm, M.; Rassaf, T., "A highlight of myoglobin diversity: The nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion". *Nitric Oxide-Biol Ch* **2010**, 22, (2), 75-82.
86. Shibata, T.; Nagao, S.; Fukaya, M.; Tai, H. L.; Nagatomo, S.; Morihashi, K.; Matsuo, T.; Hirota, S.; Suzuki, A.; Imai, K.; Yamamoto, Y., "Effect of heme modification on oxygen affinity

of myoglobin and equilibrium of the acid-alkaline transition in metmyoglobin". *J Am Chem Soc* **2010**, 132, (17), 6091-6098.

87. Gros, G.; Wittenberg, B. A.; Jue, T., "Myoglobin's old and new clothes: from molecular structure to function in living cells". *J Exp Biol* **2010**, 213, (16), 2713-2725.

88. Liu, Z. F.; Minkler, P. E.; Sayre, L. A., "Mass spectroscopic characterization of protein modification by 4-hydroxy-2-(*E*)-nonenal and 4-oxo-2-(*E*)-nonenal". *Chem Res Toxicol* **2003**, 16, (7), 901-911.

89. Bolgar, M. S.; Gaskell, S. J., "Determination of the sites of 4-hydroxy-2-nonenal adduction to protein by electrospray tandem mass spectrometry". *Anal Chem* **1996**, 68, (14), 2325-2330.

90. Alderton, A. L.; Faustman, C.; Liebler, D. C.; Hill, D. W., "Induction of redox instability of bovine myoglobin by adduction with 4-hydroxy-2-nonenal". *Biochemistry-Us* **2003**, 42, (15), 4398-4405.

91. Szuchman-Sapir, A. J.; Pattison, D. I.; Davies, M. J.; Witting, P. K., "Site-specific hypochlorous acid-induced oxidation of recombinant human myoglobin affects specific amino acid residues and the rate of cytochrome *b*₅-mediated heme reduction". *Free Radical Bio Med* **2010**, 48, (1), 35-46.

92. Markides, K. G., A., "Mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) applied to biological macromolecules". *Advanced information on the Nobel Prize in Chemistry 2002, The Royal Swedish Acedemiy of Science, Stockholm, Sweden* **2002**.

93. Felli, I. C.; Brutscher, B., "Recent advances in solution NMR: Fast methods and heteronuclear direct detection". *Chemphyschem* **2009**, 10, (9-10), 1356-1368.

94. Staunton, D.; Schlinkert, R.; Zanetti, G.; Colebrook, S. A.; Campbell, L. D., "Cell-free expression and selective isotope labelling in protein NMR". *Magn Reson Chem* **2006**, 44, S2-S9.

95. Ozawa, K.; Wu, P. S. C.; Dixon, N. E.; Otting, G., "¹⁵N-Labelled proteins by cell-free protein synthesis. Strategies for high-throughput NMR studies of proteins and protein-ligand complexes". *Febs J* **2006**, 273, (18), 4154-4159.

96. Vestling, M. M., "Using mass spectrometry for proteins". *J Chem Educ* **2003**, 80, (2), 122-124.

97. Skinner, A. L.; Laurence, J. S., "High-field solution NMR spectroscopy as a tool for assessing protein interactions with small molecule ligands". *J Pharm Sci* **2008**, 97, (11), 4670-4695.

98. Gilliland, G. L.; Ladner, J. E., "Crystallization of biological macromolecules for X-ray diffraction studies". *Curr Opin Struc Biol* **1996**, 6, (5), 595-603.

99. Bourgeois, D.; Royant, A., "Advances in kinetic protein crystallography". *Curr Opin Struc Biol* **2005**, 15, (5), 538-547.

100. Silverman, R. B., *The organic chemistry of drug design and drug action*. Elsevier Academic Press: **2004**.

101. Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A., "Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry". *Annu Rev Biochem* **2001**, 70, 437-473.
102. Steen, H.; Mann, M., "The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing". *Nat Rev Mol Cell Bio* **2004**, 5, (9), 699-711.
103. Liebler, D. C., *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. Humana Press: **2002**.
104. Gross, J., *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Verlag: **2010**.
105. Meyers, R. A., *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory, and instrumentation*. Wiley: **2000**.
106. El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J., "Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers". *Appl Spectrosc Rev* **2009**, 44, (3), 210-230.
107. Capelo, J. L.; Carreira, R.; Diniz, M.; Fernandes, L.; Galesio, M.; Lodeiro, C.; Santos, H. M.; Vale, G., "Overview on modern approaches to speed up protein identification workflows relying on enzymatic cleavage and mass spectrometry-based techniques". *Anal Chim Acta* **2009**, 650, (2), 151-159.
108. Expasy. <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html> (02/09/2011).
109. Walker, J. M., *The protein protocols handbook*. Humana Press: **2002**.
110. Clayden, J., *Organic chemistry*. Oxford Univ. Press: **2009**.
111. Ito, S.; Inoue, S.; Yamamoto, Y.; Fujita, K., "Synthesis and anti-tumor activity of cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanines and related compounds". *J Med Chem* **1981**, 24, (6), 673-677.
112. Seo, J. W.; Srisook, E.; Son, H. J.; Hwang, O.; Cha, Y. N.; Chi, D. Y., "Syntheses of NAMDA derivatives inhibiting NO production in BV-2 cells stimulated with lipopolysaccharide". *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, 15, (14), 3369-3373.
113. Cambie, R. C.; Clark, G. R.; Coombe, S. L.; Coulson, S. A.; Rutledge, P. S.; Woodgate, P. D., "Towards the synthesis of aminodibenzo[b,e][1,4]dioxin derivatives via cationic ruthenium complexes". *J Organomet Chem* **1996**, 507, (1-2), 1-21.
114. Mueller, D. D.; Morgan, T. D.; Wassenberg, J. D.; Hopkins, T. L.; Kramer, K. J., "¹H and ¹³C NMR of 3-O and 4-O conjugates of dopamine and other catecholamines". *Bioconjugate Chem* **1993**, 4, (1), 47-53.
115. Fernandez, C.; Nieto, O.; Rivas, E.; Montenegro, G.; Fontenla, J. A.; Fernandez-Mayoralas, A., "Synthesis and biological studies of glycosyl dopamine derivatives as potential antiparkinsonian agents". *Carbohydr Res* **2000**, 327, (4), 353-365.
116. Borgman, R. J.; Baylor, M. R.; McPhillips, J. J.; Stitzel, R. E., "Alpha-methyldopamine derivative. Synthesis and pharmacology". *J Med Chem* **1974**, 17, (4), 427-430.
117. Pizarro, N.; de la Torre, R.; Farre, M.; Segura, J.; Llebaria, A.; Joglar, J., "Synthesis and capillary electrophoretic analysis of enantiomerically enriched reference standards of MDMA and its main metabolites". *Bioorgan Med Chem* **2002**, 10, (4), 1085-1092.

118. Land, E. J.; Perona, A.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A., "Oxidation of *N*-substituted dopamine derivatives: irreversible formation of a spirocyclic product". *Org Biomol Chem* **2005**, 3, (13), 2387-2388.
119. Borovansky, J.; Edge, R.; Land, E. J.; Navaratnam, S.; Pavel, S.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A.; Smit, N. P. M., "Mechanistic studies of melanogenesis: the influence of *N*-substitution on dopamine quinone cyclization". *Pigm Cell Res* **2006**, 19, (2), 170-178.
120. Jameson, G. N. L.; Kudryavtsev, A. B.; Linert, W., "The oxidation of 6-hydroxydopamine in aqueous solution. Part 1. The formation of three metastable quinones at low pH". *J Chem Soc Perk T 2* **2001**, (4), 557-562.
121. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goetze, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal Biochem* **1985**, 150, (1), 76-85.
122. Miyamura, H.; Shiramizu, M.; Matsubara, R.; Kobayashi, S., "Aerobic oxidation of hydroquinone derivatives catalyzed by polymer-incarcerated platinum catalyst". *Angew Chem Int Edit* **2008**, 47, (42), 8093-8095.
123. Dalvit, C.; Fasolini, M.; Flocco, M.; Knapp, S.; Pevarello, P.; Veronesi, M., "NMR-based screening with competition water-ligand observed via gradient spectroscopy experiments: Detection of high-affinity ligands". *J Med Chem* **2002**, 45, (12), 2610-2614.
124. Jahnke, W.; Floersheim, P.; Ostermeier, C.; Zhang, X. L.; Hemmig, R.; Hurth, K.; Uzunov, D. P., "NMR reporter screening for the detection of high-affinity ligands". *Angew Chem Int Edit* **2002**, 41, (18), 3420-3423.
125. Bisaglia, M.; Soriano, M. E.; Arduini, I.; Mammi, S.; Bubacco, L., "Molecular characterization of dopamine-derived quinones reactivity toward NADH and glutathione: Implications for mitochondrial dysfunction in Parkinson disease". *Bba-Mol Basis Dis* **2010**, 1802, (9), 699-706.
126. Matrix.
http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF
(02/09/2011).
127. Nicolis, S.; Monzani, E.; Roncone, R.; Gianelli, L.; Casella, L., "Metmyoglobin-catalyzed exogenous and endogenous tyrosine nitration by nitrite and hydrogen peroxide". *Chem-Eur J* **2004**, 10, (9), 2281-2290.
128. Nicolis, S.; Pennati, A.; Perani, E.; Monzani, E.; Sanangelantoni, A. M.; Casella, L., "Easy oxidation and nitration of human myoglobin by nitrite and hydrogen peroxide". *Chem-Eur J* **2006**, 12, (3), 749-757.
129. Alvarez-Sanchez, R.; Divkovic, M.; Basketter, D.; Pease, C.; Panico, M.; Dell, A.; Morris, H.; Lepoittevin, J. P., "Effect of glutathione on the covalent binding of the ¹³C-labeled skin sensitizer 5-chloro-2-methylisothiazol-3-one to human serum albumin: Identification of adducts by nuclear magnetic resonance, matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, and nanoelectrospray tandem mass spectrometry". *Chem Res Toxicol* **2004**, 17, (9), 1280-1288.
130. Kerwin, J. L.; Turecek, F.; Xu, R. D.; Kramer, K. J.; Hopkins, T. L.; Gatlin, C. L.; Yates, J. R., "Mass spectrometric analysis of catechol-histidine adducts from insect cuticle". *Anal Biochem* **1999**, 268, (2), 229-237.

131. Kerwin, J. L., "Profiling peptide adducts of oxidized *N*-acetyldopamine by electrospray mass spectrometry". *Rapid Commun Mass Sp* **1997**, 11, (6), 557-566.
132. Stahl, E., *Thin-layer chromatography: A laboratory handbook*. Springer: **1969**.
133. Milhazes, N.; Calheiros, R.; Marques, M. P. M.; Garrido, J.; Cordeiro, M. N. D. S.; Rodrigues, C.; Quinteira, S.; Novais, C.; Peixe, L.; Borges, F., "Beta-nitrostyrene derivatives as potential antibacterial agents: A structure-property-activity relationship study". *Bioorgan Med Chem* **2006**, 14, (12), 4078-4088.
134. Marshall, K. S.; Castagnoli, N., "Absolute configuration of alpha-methyldopamine formed metabolically from alpha-methyldopa in man". *J Med Chem* **1973**, 16, (3), 266-270.
135. Senoh, S.; Witkop, B., "Non-enzymatic conversions of dopamine to norepinephrine and trihydroxyphenethylamines". *J Am Chem Soc* **1959**, 81, (23), 6222-6231.
136. Peter, M. G.; Grun, L.; Forster, H., "Cp/Mas-¹³C-NMR spectra of sclerotized insect cuticle and of chitin". *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1984**, 23, (8), 638-639.
137. Antunes, A. M. M.; Duarte, M. P.; Santos, P. P.; da Costa, G. G.; Heinze, T. M.; Beland, F. A.; Marques, M. M., "Synthesis and characterization of DNA adducts from the HIV reverse transcriptase inhibitor nevirapine". *Chem Res Toxicol* **2008**, 21, (7), 1443-1456.